



**Bruno Cabús Jacby**

Engenheiro Químico

## **Caracterização de vinagres portugueses de várias origens**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora auxiliar,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de  
Lisboa

Coorientadora: Eng.<sup>a</sup> Maria Amélia Silva,  
Técnico Superior do LSA-LBPV ASAE

Presidente: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte – FCT/UNL

Arguente: Eng.<sup>a</sup> Maria de Jesus Caetano Tavares, Diretora do  
Departamento de Riscos Alimentares e Laboratórios na ASAE

Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Leitão – FCT/UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Novembro, 2020**





**Bruno Cabús Jacby**

Engenheiro Químico

## **Caracterização de vinagres portugueses de várias origens**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Coorientadora: Eng.<sup>a</sup> Maria Amélia Silva,  
Técnico Superior do LSA-LBPV ASAE



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Novembro, 2020**

Copyright © 2020 Bruno Cabús Jacby, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Não existem métodos fáceis para resolver  
problemas difíceis.*

*René Descartes*

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais por todo apoio, incentivo e motivação durante este período de mestrado, minha mãe Vera C. Jacby e meu pai Herbert B. Jacby.

Às minhas orientadoras, Ana Lúcia Leitão e Maria Amélia Silva, pela assistência, tempo, paciência e ensinamentos concedidos para a realização deste trabalho.

Agradeço também a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), em especial ao Laboratório de Bebidas e Produtos Vitivinícolas e seus funcionários pelo apoio e espaço compartilhado para o desenvolvimento das minhas pesquisas e realização do presente estudo.

A todos que mesmo não sendo citados especificamente, me ajudaram de alguma forma durante minhas pesquisas.



## Resumo

A adulteração de vinagres pode ser detetada a partir de análises mais completas do que as de rotina normalmente realizadas, pois a acidez total, o teor de álcool residual, o extrato seco total e o teor de cinzas são facilmente corrigidos pela adição de componentes artificiais. Algumas técnicas podem detectar a origem de um produto vegetal, quer pela composição isotópica do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ), que fornece informação sobre a forma como as plantas fixam o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), quer pelos valores da razão entre isótopos estáveis Deutério e Hidrogénio, que são característicos para cada variedade de planta, quer pela razão isotópica de outros isótopos estáveis. Uma técnica usada é a espectrometria por SNIF-RMN (*Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance*). Nesta técnica é necessária uma preparação preliminar da amostra de vinagre. O presente trabalho tem como objetivo estudar a otimização desta preparação, avaliando diferentes solventes, quantidades e tempo de extração.

Além disso, foram avaliados os parâmetros físico-químicos, acidez total, álcool residual, teor de dióxido de enxofre total e a presença de compostos voláteis, por cromatografia gasosa, em vinagres comercializados em Portugal, obtidos a partir de diferentes matérias-primas. Visou-se a caracterização destes vinagres portugueses a fim de estabelecer meios de diferenciação entre os diferentes tipos de vinagres.

**Palavras-chave:** Vinagre; caracterização; extração ácido acético; SNIF/RMN; vinagres portugueses, compostos voláteis.





## Abstract

The adulteration of vinegars can be detected from more complete analyzes than those normally performed, as the total acidity, residual alcohol content, total dry extract and ash content are easily corrected by the addition of artificial components. Some techniques can detect the origin of a plant product, either by the isotopic composition of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ), which provides information on how plants fix carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ), or by the values of the ratio between stable isotopes Deuterium and Hydrogen, which are characteristic for each plant variety, either for the isotopic ratio of other stable isotopes. One technique used is SNIF-NMR spectrometry (Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance). This technique requires preliminary preparation of the vinegar sample. This work aims to study the optimization of this preparation, evaluating different solvents, quantities and extraction time.

In addition, the physical-chemical parameters, total acidity, residual alcohol, total sulfur dioxide content and the presence of volatile compounds were evaluated by gas chromatography in vinegars sold in Portugal, obtained from different raw materials. The aim was to characterize these Portuguese vinegars in order to establish ways of differentiating between different types of vinegars.

**Keywords:** Vinegar; characterization; acetic acid extraction; SNIF-NMR; Portuguese vinegars, volatile compounds.



## Índice de Matérias

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 AUTORIDADE DE SEGURANÇA ALIMENTAR E ECONÓMICA.....	2
1.2 OBJETIVO GERAL.....	3
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>5</b>
2.1 VINAGRE.....	5
<b>2.1.1 Composição do vinagre .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.2 Processos de fabrico .....</b>	<b>8</b>
2.1.2.1 Processo Lento, Orleans ou Francês .....	9
2.1.2.2 Processo Alemão ou rápido .....	10
2.1.2.3 Processos Submersos .....	11
2.1.2.4 Outros processos de produção .....	12
2.2 FRAUDE.....	14
2.3 LEGISLAÇÃO E TIPOS DE VINAGRES PORTUGUESES.....	16
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS USADOS PARA TESTAR A AUTENTICIDADE E QUALIDADE.....	18
2.5 SITE SPECIFIC NATURAL ISOTOPIC FRACTIONATION STUDIED BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE.....	23
<b>2.5.1 Determinação das razões isotópicas no sítio específico .....</b>	<b>23</b>
2.6 FOTOSSÍNTESE.....	24
<b>2.6.1 Fixação do Carbono em Plantas C<sub>3</sub>.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6.2 Fixação do Carbono em Plantas C<sub>4</sub>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.3 Fixação do Carbono em Plantas CAM .....</b>	<b>28</b>
2.7 IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS.....	28
<b>2.7.1 Éter Etilíco.....</b>	<b>30</b>
<b>2.7.2 Acetato de Etilo .....</b>	<b>30</b>
<b>2.7.3 Ácido Acético .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7.4 Hidróxido de sódio (Lentilhas, PA) .....</b>	<b>31</b>
2.8 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	32
<b>2.8.1 Extração do ácido acético.....</b>	<b>32</b>
<b>2.8.2 Purificação do ácido acético.....</b>	<b>34</b>
<b>2.8.3 Efeito da concentração de ácido acético .....</b>	<b>35</b>
2.9 CROMATOGRAFIA GASOSA .....	36
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>39</b>
3.1 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ DO VINAGRE.....	39
<b>3.1.1 Reagentes e equipamentos.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.2 Técnica .....</b>	<b>39</b>
3.2 DETERMINAÇÃO DO ÁCOOL RESIDUAL.....	39
<b>3.2.1 Reagentes e equipamentos.....</b>	<b>39</b>

<b>3.2.2 Técnica .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3 DETERMINAÇÃO DE METANOL, ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILO.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.1 Reagentes e equipamentos.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.2 Técnica .....</b>	<b>40</b>
3.3.2.1 Cálculo .....	40
<b>3.4 DIÓXIDO DE ENXOFRE TOTAL.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4.1 Reagentes e equipamentos.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4.2 Técnica .....</b>	<b>42</b>
3.4.2.1 Dióxido de enxofre livre.....	42
3.4.2.2 Dióxido de enxofre combinado .....	42
3.4.2.3 Interferência de outras substâncias .....	42
3.4.2.4 Cálculo .....	42
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>43</b>
4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE ISOTÓPICA (D/H) POR SNIF-RMN.....	43
4.2 ACIDEZ TOTAL DO VINAGRE.....	45
4.3 ÁLCOOL RESIDUAL.....	46
4.4 DIÓXIDO DE ENXOFRE TOTAL.....	47
4.5 METANOL, ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILO.....	48
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>59</b>

## Índice de Figuras

<b>FIGURA 2.1 - ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO VINAGRE.....</b>	<b>8</b>
<b>FIGURA 2.2 - RECIPIENTE UTILIZADO PARA ELABORAÇÃO DE VINAGRE PELO PROCESSO ORLEANS.....</b>	<b>9</b>
(ADAPTADO DE PROARTAL, 2018). .....	9
<b>FIGURA 2.3 - CORTE TRANSVERSAL DE UM ACETIFICADOR COM SUPORTE POROSO. ....</b>	<b>10</b>
(ADAPTADO DE PROARTAL, 2018). .....	10
<b>FIGURA 2.4 - ACETIFICADOR <i>FRINGS</i> EM AÇO INOXIDÁVEL. ....</b>	<b>11</b>
(BEVTEC, 2020). .....	11
<b>FIGURA 2.5 - MÉTODOS GERAIS DE PRODUÇÃO PARA VINAGRE.....</b>	<b>13</b>
<b>FIGURA 2.6 - DESTINO DO ÁTOMO DE CARBONO NO CO<sub>2</sub>.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 2.7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DE CALVIN.....</b>	<b>26</b>
(ADAPTADO DE KHAN ACADEMY, 2020). .....	26
<b>FIGURA 2.8 - ANATOMIA FOLIAR DE PLANTAS C<sub>3</sub> E C<sub>4</sub>.....</b>	<b>26</b>
(ADAPTADO DE SADAVA ET AL., 2019). .....	26
<b>FIGURA 2.9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO C<sub>4</sub>.....</b>	<b>27</b>
(ADAPTADO DE KHAN ACADEMY, 2020). .....	27
<b>FIGURA 2.10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO CAM.....</b>	<b>28</b>
(ADAPTADO DE BOFFO, 2004). .....	28
<b>FIGURA 2.11 - DIAGRAMA DE HOMMEL DO ACETATO DE ÉTILO. ....</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA 2.12 - RISCOS DO ÉTER ETÍLICO. ....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 2.13 - RISCOS DO ACETATO DE ETILO. ....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 2.14 - RISCOS DO ÁCIDO ACÉTICO. ....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURA 2.15 - RISCOS DO HIDRÓXIDO DE SÓDIO.....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURA 2.16 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DE UM VINAGRE SEM SUPRESSÃO DO SINAL DO SOLVENTE.....</b>	<b>32</b>
(ADAPTADO DE BOFFO, 2004). .....	32
<b>FIGURA 2.17 - DIAGRAMA DO DISPOSITIVO DE DESTILAÇÃO COM COLUNA DE CADIOT.....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA 2.18 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE VINAGRE.....</b>	<b>37</b>
<b>FIGURA 4.1 - RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO E PH DA AMOSTRA.....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 4.2 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE VINAGRE DE SIDRA. ....</b>	<b>48</b>
<b>FIGURA 4.3 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE VINAGRE DE VINHO TINTO. ....</b>	<b>48</b>
<b>FIGURA 4.4 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE VINAGRE DE VINHO BRANCO.....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 4.5 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE VINAGRE DE ARROZ. ....</b>	<b>49</b>



## Índice de Tabelas

<b>TABELA 2.1</b> - PRINCIPAIS USOS DO VINAGRE. ....	6
<b>TABELA 2.2</b> - ALGUNS USOS DO VINAGRE COMO MEDICAMENTO. (ADAPTADO DE AQUARONE <i>ET AL.</i> , 2001). ...	7
<b>TABELA 2.3</b> - COMPARAÇÃO ENTRE PROCESSOS DE ACETIFICAÇÃO (ADAPTADO DE AQUARONE <i>ET AL.</i> , 2001). .....	12
<b>TABELA 2.4</b> - TIPOS DE VINAGRES. ....	16
<b>TABELA 2.5</b> - CARACTERÍSTICAS DOS VINAGRES. ....	17
<b>TABELA 2.6</b> - MÉTODOS OFICIALMENTE RECONHECIDOS PARA TESTAR A AUTENTICIDADE E QUALIDADE DO VINAGRE. ....	18
<b>TABELA 2.7</b> - OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO COM ACETATO DE ETILO E ÉTER DIETÍLICO. ....	33
<b>TABELA 2.8</b> - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO E VALOR DE $(D/H)_{CH_3}$ PELO MÉTODO DE DESTILAÇÃO EXTRATIVA COM ACETATO DE ETILO E ÉTER DIETÍLICO (ADAPTADO DE KO <i>ET AL.</i> , 2013). ....	34
<b>TABELA 2.9</b> - RELAÇÃO ISOTÓPICA $^2H/^1H$ POR COMPOSTO.....	36
<b>TABELA 2.10</b> - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO NO VALOR DE $(D/H)_{CH_3}$ . ....	36
<b>TABELA 3.1</b> - PROGRAMA DO FORNO UTILIZADO NA CROMATOGRAFIA GASOSA. ....	40
<b>TABELA 4.1</b> - EXTRAÇÃO COM (A) =7, (B) =5 E (C) =2/1. ....	44
<b>TABELA 4.2</b> - EXTRAÇÃO COM (A) =4, (B) =15 E (C) =1/1. ....	45
<b>TABELA 4.3</b> - ANÁLISE DA CONFORMIDADE DA ACIDEZ TOTAL NAS AMOSTRAS DE VINAGRE. ....	46
<b>TABELA 4.4</b> - ANÁLISE DA CONFORMIDADE DO ÁLCOOL RESIDUAL NAS AMOSTRAS DE VINAGRE. ....	46
<b>TABELA 4.5</b> - ANÁLISE DA CONFORMIDADE DO DIÓXIDO DE ENXOFRE TOTAL NAS AMOSTRAS DE VINAGRE. ....	47





## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

<b>ASAE</b>	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
<b>CAM</b>	Metabolismo do ácido crassuláceo
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>C<sub>3</sub></b>	Termo aplicado para denotar a via metabólica seguida pela maioria das plantas para assimilação do CO <sub>2</sub> durante a fotossíntese (ciclo de Calvin)
<b>C<sub>4</sub></b>	Termo aplicado para denotar a via metabólica seguida, principalmente, pelas gramíneas tropicais para assimilação do CO <sub>2</sub> durante a fotossíntese.
<b>DOP</b>	Denominação de Origem Protegida
<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa
<b>IMARC</b>	<i>Information Management Research Centre</i>
<b>IGP</b>	Indicação Geográfica Protegida
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
<b>OENO</b>	<i>Oenological Practices</i>
<b>OIV</b>	Organização Internacional da Vinha e do Vinho
<b>pH</b>	Potencial de hidrogénio
<b>RuBP</b>	Ribulose 1,5-bifosfato
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>SNIF-NMR</b>	<i>Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>SO<sub>2</sub></b>	Dióxido de enxofre
<b>TMU</b>	<i>N,N</i> -Tetrametiluréia
<b>t<sub>R</sub></b>	Tempo de retenção



## 1. INTRODUÇÃO

O vinagre é o produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola.

É produzido em todo o mundo a partir de uma variedade de materiais, usando diferentes metodologias de produção. O ácido acético é o composto de sabor dominante no vinagre (Budak *et al.*, 2014).

O vinagre é mais conhecido como um condimento, uma vez que atribui gosto e aroma aos alimentos. Porém, além do uso alimentar, o vinagre possui diversas aplicações e pode ser usado como conservante, fungicida, medicamento, produto de higiene e limpeza.

De acordo com a informação publicada recentemente pelo *Information Management Research Centre* (IMARC), o mercado global de vinagre atingiu o valor de 1,3 bilhão de dólares em 2019. Maçã, vinho, coco, malte, cana de açúcar e arroz são alguns dos tipos mais comuns de vinagre disponíveis no mercado. Nos últimos anos, também houve um aumento na procura por produtos de vinagre biológico e sem glúten entre os consumidores preocupados com a saúde. Espera-se ainda que o mercado atinja um valor de 1,40 bilhão de dólares em 2025, expandindo-se a uma taxa de 1,4% durante 2020-2025 (IMARC, 2020).

Como solução diluída de ácido acético, é sempre elaborado por dois processos consecutivos: a fermentação alcoólica, em que o açúcar existente na fonte declarada do produto é convertido em etanol; e a oxidação fermentativa, transformando o álcool em ácido acético (Veloso, 2013).

A adulteração de vinagres de vinho, de frutas, de mel, e outros, com vinagres de açúcar ou de destilados, pode ser detetada a partir de análises mais completas do que as de rotina normalmente realizadas, pois a acidez, o teor de álcool residual, o extrato seco e as cinzas são facilmente corrigidos pela adição de componentes artificiais (Aquarone *et al.* 2001).

As técnicas analíticas que podem detetar a origem do vinagre baseiam-se quer na forma como a planta fixa o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), quer nos valores da razão entre isótopos estáveis Deutério e Hidrogénio, que são característicos para cada variedade de planta.

De acordo com a forma de fixação do  $\text{CO}_2$  as plantas podem ser separadas em plantas  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  ou CAM com base no primeiro produto da fixação do  $\text{CO}_2$ , ser uma molécula de três ou de quatro carbonos (Sadava *et al.*, 2019).

Segundo Ferreira (2008), a medição das razões de isótopos estáveis nomeadamente  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  e  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ , são atualmente utilizados em muitos laboratórios nas mais diversas áreas, das quais se destacam o controlo da autenticidade de alimentos e bebidas, a arqueologia, o ambiente, a ciência forense, entre muitas outras. Fazendo parte das metodologias analíticas mais poderosas usadas para a deteção da autenticidade de alimentos, são capazes de discriminar a origem geográfica dos produtos e de detetar a adulteração com compostos sintéticos e a utilização de práticas de produção agrícolas ilegais.

Deste modo para determinar a origem de um vinagre, pode-se utilizar a técnica de Análise Isotópica por Ressonância Magnética Nuclear em sítio específico conhecido pela sigla SNIF-NMR. Vinagres produzidos com matérias-primas de origem agrícola apresentam menor relação  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , em

comparação com vinagres adulterados com matérias-primas originárias do petróleo, como o ácido acético e o etanol (Marques, 2008).

As técnicas cromatográficas têm sido amplamente aplicadas para determinar certos compostos úteis para caracterizar, classificar ou detetar adulteração em vinagres. A cromatografia gasosa (GC) é a técnica usada para a determinação do teor de acetoína, metanol, álcoois superiores e acetato de etilo (OENO 70, 2000; OENO 69, 2000), e também foi aplicada na determinação de poliálcoois em vinagres. Estas determinações são importantes quando se avalia a qualidade e origem de vinagres (Callejón *et al.*, 2015).

A fraude alimentar e a adulteração do que comemos e bebemos é um problema global que tem vindo a piorar nos últimos anos. Têm-se observado a substituição de ingredientes genuínos e cotidianos por alternativas mais baratas que enganam compradores e consumidores, podendo causar alergias, efeitos colaterais e danos ainda mais graves à saúde humana (Eurofins, 2019).

## 1.1 AUTORIDADE DE SEGURANÇA ALIMENTAR E ECONÓMICA

A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) é a autoridade competente, responsável por assegurar a execução e garantir o cumprimento do controlo das regras gerais de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios Regulamento (CE) nº 852/2004, e das regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, o Regulamento (CE) nº 853/2004, ou seja, conforme disposto nos artigos 2º e 5º, ambos do Decreto-Lei nº 113/2006 alterado pelo Decreto-Lei nº 223/2008, responsável por fiscalizar toda a cadeia alimentar desde a produção primária, indústria e retalho (incluindo o *e-commerce*) (para além das competências atribuídas pelos demais diplomas legais nacionais) (ASAE, 2018).

A ASAE tem por missão a fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora do exercício das atividades económicas, nos setores alimentar e não alimentar, bem como a avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar, sendo o organismo nacional de ligação com as suas entidades congéneres, a nível europeu e internacional (ASAE, 2020a).

A ASAE rege-se pelos princípios da independência científica, da precaução, da credibilidade e transparência e da confidencialidade (ASAE, 2016).

O Laboratório de Bebidas e Produtos Vitivinícolas (LBPV), integrado no Departamento de Riscos Alimentares e Laboratórios, desenvolve a sua atividade no domínio dos ensaios laboratoriais de natureza físico-química em bebidas e outros produtos de origem vínica e outras, nomeadamente, mostos, vinhos, vinagres, bebidas aromatizadas, cervejas, sidras, sumos, bebidas espirituosas e azeites (ASAE, 2020a).

Nestes âmbitos, encontra-se apto a controlar os limites legais, estabelecidos em legislação nacional e comunitária aplicáveis e a detetar vários tipos de falsificação e/ou fraude em diversas vertentes: práticas proibidas, genuinidade, apropriação de marca (ASAE, 2020b).

Merece igualmente destaque o facto do LBPV ser uma unidade laboratorial acreditada pelo IPAC para cerca de 50 ensaios em várias matrizes, vendo assim a sua competência técnica

reconhecida. É também Laboratório reconhecido como laboratório oficial de controlo no sector vitivinícola (ASAE, 2020b).

## 1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros físico-químicos e a presença de compostos voláteis em vinagres comerciais obtidos a partir de diferentes matérias-primas.

Efetuar a caracterização dos vinagres portugueses a fim de estabelecer meios de diferenciação entre as diferentes matérias-primas dos vinagres.

Desenvolver um procedimento de preparação de amostras de vinagres para a avaliação de autenticidade para análise em SNIF/RMN.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os parâmetros físico-químicos (acidez total, álcool residual, teor de dióxido de enxofre total) dos vinagres de diferentes origens quanto aos padrões de identidade e qualidade para vinagres comerciais;

Comparar os valores determinados a partir das análises físico-químicas com os padrões estabelecidos pela legislação vigente;

Quantificar e avaliar a presença de compostos voláteis nos diferentes vinagres;

Otimizar a preparação de amostras de vinagres de diferentes origens para análise de autenticidade em SNIF/RMN.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 VINAGRE

Por definição, o vinagre é o produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola. Conhecido por muitos apenas como um condimento azedo, o vinagre possui propriedades nutritivas, organoléticas, sanitizantes e até medicinais. O vinagre é um alimento conhecido há milhares de anos, e o seu nome de batismo vem do latim “Vinu agre” ou vinho azedo (Moreno *et al.*, 2015).

De acordo com Aquarone *et al.* (2001), o vinagre, originalmente, era obtido do vinho de uvas e da cerveja, por fermentação espontânea. Há menções do vinagre no Antigo e Novo Testamento. Plínio descreve a passagem de Cleópatra preparando uma bebida pela solubilização de pérolas em vinagre. Hipócrates considerava-o medicamentoso, já os romanos usavam a “posca”, bebida preparada com vinagre e ovo.

Em 1790 Lavoisier comprovou cientificamente a responsabilidade do oxigênio na formação do vinagre, e Pasteur, anos mais tarde comprovou a necessidade de um fermento vivo para a transformação do etanol em ácido acético. Em 1822 Dobereiner descreveu a primeira equação química representando a formação do ácido acético a partir do etanol (Aquarone *et al.*, 2001).

A qualidade de um vinagre é difícil de definir, mas está relacionada com o sabor e aroma, maciez, limpidez e composição dentro dos padrões definidos pela legislação específica. Os vinagres podem ser classificados pelos seus substratos de origem ou pelos seus sistemas de produção.

Ao contrário do que ocorre com os vinhos, o aparecimento no vinagre de sabor e aroma característicos da matéria-prima que o originou não deprecia a sua qualidade e, por vezes, até melhora (Aquarone *et al.*, 2001).

Na Tabela 2.1 e Tabela 2.2, estão apresentadas algumas curiosidades a respeito do vinagre, em relação aos seus principais usos e também como medicamento.



**Tabela 2.1** - Principais usos do vinagre.

Utilização	Ação esperada
Saladas	Sabor, assepsia
Ovos	Aumento da resistência da casca, desodorização
Pães, panetonesm biscoitos	Fungicida
Alimentação dietética	Substituto do sal
Banhos (pele)	Estimulante, detergente, adstringente, antisséptico
Cabelos	Maciez e brilho
Ferimentos e assaduras	Antisséptico e cicatrizante
Metais	Remoção de óxidos

No artigo de revisão de Budak *et. al.* (2014) sobre vinagre são descritos vários benefícios na saúde, como por exemplo efeito antioxidante, antidiabético, antimicrobiano, antiobesidade e antitumoral, derivados do consumo de componentes deste produto fermentado. Os componentes bioativos responsáveis pelos efeitos terapêuticos incluem o ácido acético, ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-coumárico e ácido ferúlico.

Segundo Gopal *et. al.* (2019), o vinagre de sidra de maçã (VSM) é um desses remédios populares, pouco validados cientificamente. No estudo, foi provado que a atividade antimicrobiana era inequívoca no VSM, porém o efeito foi observado para concentrações elevadas. Por outro lado, a atividade não foi generalizada porque, embora uma forte atividade antibacteriana tenha sido observada em concentrações de 25%, em termos de atividade antifúngica, verificou-se que as leveduras, especialmente *Candida*, eram menos suscetíveis. As propriedades antimicrobianas e antioxidantes foram determinadas pelo conteúdo fenólico total do VSM, confirmado pela caracterização dos compostos bioativos e atividade antioxidante. Quanto à citotoxicidade, o VSM exibiu toxicidade mesmo em concentrações tão baixas quanto 0,7%. Estes resultados parecem indicar que o seu uso é benéfico, mas serão necessárias mais validações *in vitro* e *in vivo* para avaliar com precisão os prós e os contras do vinagre de sidra de maçã.

**Tabela 2.2** - Alguns usos do vinagre como medicamento. (Adaptado de Aquarone *et al.*, 2001).

Doença	Tipo de Vinagre	Ação esperada
Acne	Vinho ou sidra de maçã	Remove cicatrizes
Artrite	Sidra de maçã	Diminui a dor
Queimadura	Sidra de maçã	Diminui a dor
Congestão	Sidra de maçã	Reduz o muco
Caspa	Sidra de maçã	Diminui
Dor de cabeça	Ervas	Diminui a dor
Soluços	Vinho	Interrompe
Calos	Vinho	Remove
Urticária	Vinho	Alivia o prurido e ardor
Dor de garganta	Vinho	Diminui a dor
Varizes	Sidra de maçã	Contraí as veias

### 2.1.1 Composição do vinagre

O vinagre é composto por:

- **Ácido acético (g/L):** o principal componente do vinagre, independentemente de qual tenha sido o substrato que lhe deu origem (Xavier *et al.*, 2009).
- **Álcool etílico (etanol) residual %(v/v):** quantidade residual de álcool que não foi oxidado a ácido acético. Quando ocorre a produção industrial do vinagre, procura-se obter o maior nível de rendimento na transformação de etanol em ácido acético. Ainda assim, não deve haver esgotamento desse substrato, pois as bactérias acéticas, na ausência de álcool etílico, são capazes de promover a degradação do ácido acético produzido (Xavier *et al.*, 2009).
- **Extrato seco (g/L):** constituído por substâncias não voláteis presentes, tais como glicerina, substâncias pécicas, substâncias nitrogenadas, entre outras. Teores muito baixos ou muito elevados de extrato seco no produto podem indiciar fraudes no processo de produção (Xavier *et al.*, 2009).
- **Cinzas (g/L):** o teor de cinzas determina os minerais contidos no produto, e pode também determinar fraudes no processo de produção, caso se observe um teor ou muito alto ou muito baixo (Xavier *et al.*, 2009).

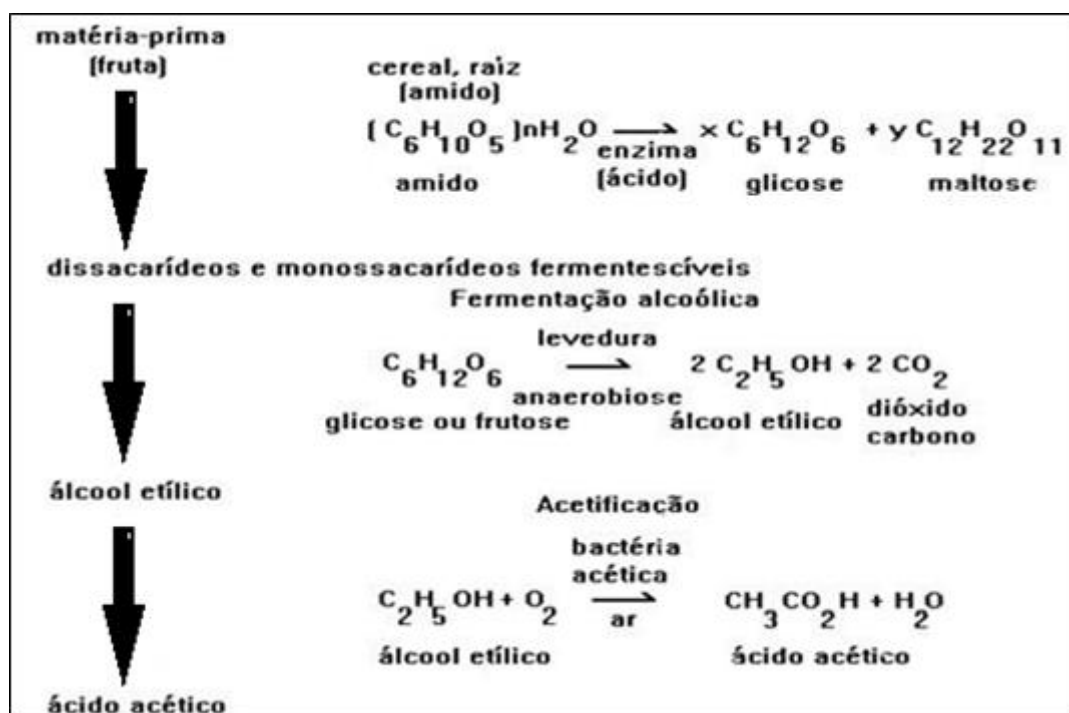
### 2.1.2 Processos de fabrico

A fermentação define-se como um processo de reações químicas controladas enzimaticamente, onde acontece a degradação de moléculas orgânicas em compostos mais simples, de modo a libertar certa quantidade de energia (Veloso, 2013).

O Louis Pasteur, por volta de 1857, demonstrou que para ocorrer a produção do vinagre a partir do vinho, seria necessário a presença da bactéria acética e não apenas a exposição ao ar. A fermentação acética acontece quando o álcool é transformado, através da ação dessas bactérias, em ácido acético (Carvalho *et al.*, 2005).

O objetivo da produção de vinagre é a transformação do etanol de modo a obter a maior quantidade possível de ácido acético. No entanto, em vinagres feitos tradicionalmente, o etanol residual é geralmente mais alto; de facto, a presença de um pequeno teor de etanol é necessária por dois motivos: por um lado, o etanol inibe o ciclo de Krebs, que usa ácido acético, e por outro lado, é desejado se o produto for submetido ao processo de envelhecimento.

Para chegar até ao ácido acético do vinagre, o açúcar da matéria-prima, passa por dois processos sucessivos, primeiro uma fermentação alcoólica, quando o açúcar é convertido em álcool etílico e depois uma oxidação fermentativa, onde o etanol é transformando em ácido acético (Figura 2.1).



**Figura 2.1** - Etapas do processo de produção do vinagre.  
(Adaptado de Xavier *et al.*, 2009).

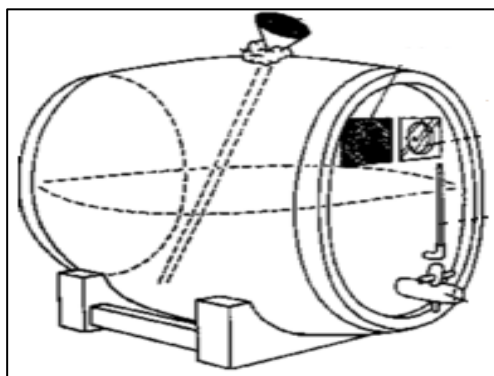
Quanto ao teor alcoólico, de acordo com Rizzon & Meneguzzo (2002), é interessante que o vinho apresente entre 8% (v/v) e 10% (v/v), embora as técnicas atuais de fermentação acética permitam utilizar vinhos com 10% (v/v) a 12% (v/v) de álcool. A acetificação de vinhos com teor alcoólico muito

alto torna o processo mais lento e difícil, podendo causar problemas de paragem do processo, devido à ação inibidora do álcool ou do próprio ácido acético presente.

#### 2.1.2.1 *Processo Lento, Orleans ou Francês*

Segundo Spinosa (2002), o processo Lento, Orleans ou Francês é o mais antigo e consiste, basicamente, na produção de vinagre a partir do vinho ou substrato alcoólico colocado em barricas de madeira parcialmente cheias, a temperatura elevada. A fermentação acontece, nesse caso, devido à ação de bactérias acéticas através da exposição do substrato alcoólico ao ar.

Essas barricas, Figura 2.2, possuem uma torneira para saída do vinagre, e na sua parte superior há uma entrada para o substrato alcoólico. Este substrato é renovado à medida que o vinagre é produzido.



**Figura 2.2** - Recipiente utilizado para elaboração de vinagre pelo processo Orleans.  
(Adaptado de Proartal, 2018).

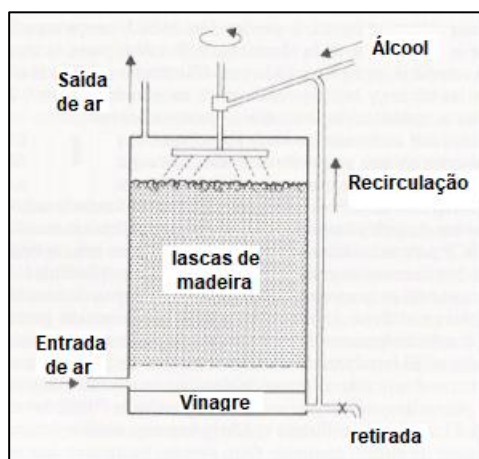
Segundo Rizzon & Meneguzzo (2002), para iniciar o processo de produção do vinagre, é recomendado adicionar cerca de 10% do volume útil do acetificador de um vinagre não pasteurizado, ou seja, com bactérias ativas, objetivando constituir um inóculo ou pé-de-cuba que irá contribuir para uma rápida fermentação inicial. Depois de 15 dias, pode-se retirar cerca de 10% do volume de vinagre, que deve ser substituído pelo mesmo volume de vinho para acetificar. Depois disso, a retirada de vinagre e a colocação de vinho ou outro substrato pode ser realizada semanalmente.

De acordo com Suman (2012), o produto formado pelo processo lento é um vinagre de boa qualidade, praticamente limpo, que dispensa filtração ou clarificação. Este tipo de processamento é de baixa produtividade, ocupa muito espaço e atualmente é usado exclusivamente para a produção doméstica. No caso, o fator limitante para a quantidade produzida é o fornecimento de oxigênio, já que este equipamento não conta com nenhum tipo de arejador.

### 2.1.2.2 Processo Alemão ou rápido

O processo rápido é bastante utilizado atualmente, porque segundo este processo obtém-se um vinagre bom, porém com baixo rendimento. O método surgiu na Alemanha no início do século XIX, a partir da observação da importância do arejamento no processo Lento, tornando-se o principal método de produção industrial do vinagre até meados do século XX (Spinosa, 2002).

Ainda segundo Spinosa (2002), o sistema de produção utiliza um gerador em formato de tanque cilíndrico (Figura 2.3) dividido em três compartimentos: a secção superior, onde acontece o processo de avinagramento, por meio de um dispositivo borrifador; a secção maior (a do meio), a qual é preenchida com aparas de madeira, sabugos de milho ou outro material que permita a passagem de ar e onde acontece a oxidação do álcool em ácido acético, devido à ação das bactérias acéticas; e por fim, a secção inferior, onde é depositado o vinagre. A passagem de uma secção para a outra ocorre através de gotejamento.



**Figura 2.3** - Corte transversal de um acetificador com suporte poroso.  
(Adaptado de Proartal, 2018).

As bactérias acéticas colonizam a superfície do material e oxidam o etanol a ácido acético. A matéria-prima é recirculada desde a parte inferior da tina até à parte superior. Este material passa pela madeira, sabugo ou carvão, onde as bactérias acéticas ficam fixadas, transformando o conteúdo alcoólico em ácido acético. A recirculação ocorre quantas vezes forem necessárias até total transformação do etanol (Spinosa, 2002).

O processo Alemão pode apresentar dificuldades na manutenção tanto do espaço físico (que deve ser amplo), quanto nos cuidados com a estrutura dos materiais, como a secagem da madeira, utilizando bombas potentes e resistentes a ácidos, fazendo a substituição anual de todo o material, de entre outros. Por outro lado, o custo para implementar uma mudança nesta tecnologia de produção do vinagre é muito alto, o que faz com que alguns produtores ainda utilizem o método Alemão (Spinosa, 2002).

### 2.1.2.3 Processos Submersos

Os processos submersos surgiram em 1950. O método baseia-se em manter a cultura de bactérias acéticas, responsáveis pela acetificação, submergidas no vinho com retirar do ar. Após a acetificação da matéria-prima, é feita a descarga de uma parte de vinagre, sendo reposta com uma parte de vinho, sem parar o processo. O processo de transformação leva em média 20 horas (Suman, 2012).

O substrato é colocado no fermentador e inoculado com vinagre forte ou com bactérias acéticas. Existe no equipamento um aparelho que registra o teor alcoólico do meio e que também é responsável por dispensar o vinagre pronto, todo o sistema é automatizado. O produto final deve conter 0,2% de álcool (Veloso, 2013).

Segundo Aquarone *et al.* (2001), por este processo, o substrato alcoólico, é fermentado mais rapidamente que por qualquer outro, em até 30 vezes mais. Neste processo, o ar deve ser controlado cuidadosamente, pois um decréscimo da pressão parcial de oxigênio altera o metabolismo bacteriano.

O equipamento mais utilizado na indústria do vinagre no processo submerso é o *Acetador Frings* (Figura 2.4), patenteado por Heinrich Frings em 1932 (Spinosa, 2002).



**Figura 2.4** - Acetificador *Frings* em aço inoxidável. (BEVTEC, 2020).

O processo de fermentação submersa apresenta uma série de vantagens como, alta eficiência, rendimentos de produção que alcançam 90 a 95%, e a praticidade que dispensa tratamentos de clarificação e de filtração (Suman, 2012).

Conforme Aquarone *et al.* (2001), os principais processos de produção de vinagre podem oferecer produtos de ótima qualidade desde que os requisitos básicos do processo sejam rigorosamente observados. No entanto, em relação a outros fatores, como custo do equipamento, produtividade, as diferenças são imensas. A Tabela 2.3, compara esses processos em relação aos fatores considerados mais significativos.

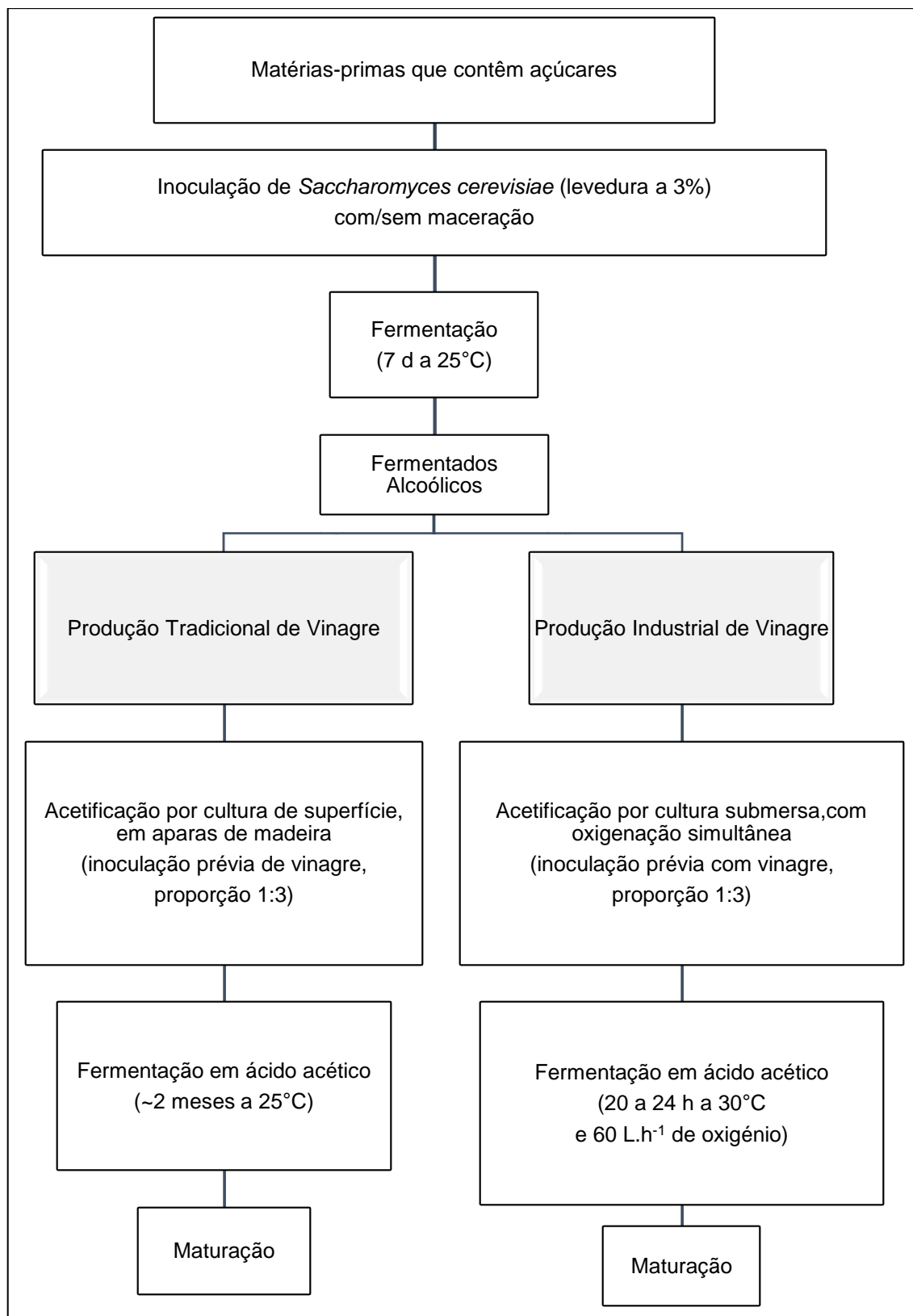
**Tabela 2.3** - Comparação entre processos de acetificação (Adaptado de Aquarone *et al.*, 2001).

	Lento	Tipo de processo Rápido	Submerso
Qualidade do vinagre	Ótima	Depende do envelhecimento	Depende do envelhecimento
Custo do equipamento	Baixo	Alto	Alto
Rendimento do processo	Variável	Variável	Alto
Produtividade	Baixa	Variável	Alta
Volume de produção	Pequeno	Médio	Grande

#### 2.1.2.4 Outros processos de produção

No estudo de Tanamool *et al.* (2020) foram utilizadas cascas de abacaxi como alternativa de matéria-prima para a preparação de vinagre. Recorreram a uma bactéria acética termotolerante (TH-AAB), a *Acetobacter pasteurianus* FPB2-3, que mostrou, previamente, ter elevada tolerância a ácido acético e etanol. O processo foi realizado segundo o método designado por fermentação simultânea de vinagre, onde a levedura (*Saccharomyces cerevisiae* var. *montache*) e a bactéria trabalham juntas, usando subprodutos de abacaxi que podem ser eficazes na obtenção de produtos finais alternativos e de valor agregado, em conformidade com os requisitos de qualidade dos alimentos. A acumulação de ácido acético começou após 5 dias e aumentou gradualmente até uma concentração máxima de 7,2% (p/v) em 16 dias. No entanto, na fermentação realizada em vasos de 6 litros (*scaled-up* da experiência realizada anteriormente) observou-se uma acumulação mais lenta de ácido acético, e uma concentração máxima de 6,5% (p/v) após 25 dias.

A Figura 2.5 mostra uma comparação entre métodos gerais de produção para vinagre (tradicional e industrial).



**Figura 2.5** - Métodos gerais de produção para vinagre.



## 2.2 FRAUDE

A detecção de Fraude Alimentar não é o mesmo que Segurança Alimentar. Enquanto, os fatores determinantes na Segurança Alimentar são os perigos alimentares, na Fraude Alimentar, os fatores determinantes são as infrações económicas que visam o lucro. A Fraude Alimentar, ocorre quando há um potencial de lucro económico elevado e um baixo risco de ser detetado (ASAE, 2016).

O vinagre é regulado por diferentes padrões e até a própria definição legal varia de país para país. Mais recentemente, a Comissão Europeia publicou o Regulamento (UE) 2016/263 que altera o anexo II do Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e Conselho no que diz respeito ao título da categoria de alimentos 12.3 Vinagres. O novo título da categoria de alimentos 12.3 é agora: Vinagres e ácido acético diluído (diluído em água a 4-30% em volume).

Segundo Callejón *et al.* (2015), esta categoria foi renomeada porque, em alguns Estados-Membros, apenas os vinagres obtidos da fermentação de produtos agrícolas são denominados de "vinagres". Noutros Estados-Membros, no entanto, ambos os produtos obtidos a partir da diluição em água de ácido acético e os vinagres obtidos a partir da fermentação de produtos agrícolas são comercializados sob o nome "vinagre".

Devido às diferenças observadas nas leis sobre o vinagre de um país para outro, fica claro que, se um vinagre produzido num país é comercializado noutro país no qual a definição de vinagre muda, isso representa um problema e risco para os consumidores e pode tornar-se uma questão de autenticidade se a sua origem não for claramente declarada.

Por exemplo, enquanto na União Europeia, o termo vinagre descreve “um produto de dupla fermentação (fermentação alcoólica e acética) de substâncias de origem agrícola”, nos EUA um “ácido acético produzido sinteticamente diluído em água” também pode ser rotulado como vinagre.

Outro exemplo desse problema ocorre entre a Alemanha e outros países europeus. Segundo Werner & Roßmann (2015), a definição legal alemã de "vinagre de vinho" permite a produção de vinagre por fermentação acética a partir de etanol natural, diluindo ácido acético com água ou misturando vinagre de fermentação com ácido acético sintético ou com vinagre feito com ácido acético sintético.

De acordo com Grégrová *et al.* (2012), um dos principais problemas da indústria do vinagre reside na difícil distinção entre o uso de matérias-primas de baixa e alta qualidade, entre os verdadeiros vinagres ricos em extratos das matérias-primas ou das suas misturas, além de distinguir entre os mais valiosos, vinagres de vinho de alta qualidade ou vinagres balsâmicos envelhecidos e as suas alternativas mais baratas derivadas de outras matérias-primas, como malte ou álcool e/ou adulteração de vinagre com ácido acético diluído.

Segundo Callejón *et al.* (2015) os principais tipos de fraudes que acontecem na indústria do vinagre são:

- **Adição de ácido acético puro:** Uma das primeiras fraudes que ocorre há mais de oitenta anos, é a adição de ácido acético puro ou não biológico a diferentes tipos de vinagre. Este é denominado vinagre de madeira ou essência de vinagre, e não pode ser vendido como vinagre fermentado, pois contém mais metais pesados por kg de ácido acético puro que a quantidade permitida regulada (máximo de 5 mg/kg de acético puro ácido), o que supõe um risco para o consumidor.
- **Adição de água a uvas secas ou a mostos concentrados:** Denominado por "vinagre de passas" é comumente produzido em alguns países do Mediterrâneo através da fermentação de uvas secas e reidratando com água da torneira.
- **Uso de álcool ou açúcar não proveniente de vinho:** Outra prática que ocorre atualmente é a adição de diferentes proporções de vinagre de álcool às amostras de vinagre de vinho, o que torna o produto mais barato. Essas adulterações são difíceis de detetar porque o álcool adicionado ao vinho base antes do início do processo de fermentação nem sempre tem uma origem botânica bem conhecida.
- **Misturas de diferentes tipos de vinagres:** O problema de autenticidade neste caso ocorre quando essa mistura é vendida sob a denominação de vinagre de vinho, como se fosse um produto puro.
- **Processo de produção e envelhecimento:** Há um interesse crescente em diferenciar os vinagres produzidos por um método tradicional daqueles produzidos por um método de produção rápida, devido ao facto não só de o primeiro estar associado a uma qualidade mais alta, mas também a um tempo de processamento de produção mais longo e a um custo mais alto.

Um outro problema de autenticidade surge quando há um tempo mínimo especificado para um vinagre específico, como no caso dos vinagres de xerez ou vinagre balsâmico tradicional de Modena, sendo este último vendido somente após o processo de envelhecimento de pelo menos 12 anos num conjunto de barris de madeira de volume decrescente (Consonni *et al.*, 2008).

Além disso, existe uma necessidade crescente de desenvolver métodos simples capazes de detetar metabolitos específicos nos vinagres como possíveis indicadores para o processo de envelhecimento e procedimentos tradicionais, a fim de proteger os consumidores e evitar competições injustas (Callejón *et al.*, 2015).

## 2.3 LEGISLAÇÃO E TIPOS DE VINAGRES PORTUGUESES

O Decreto-Lei n.º 174/2007- Diário da República n.º 88/2007, Série I de 2007-05-08 define as características e classificação do vinagre destinado à alimentação humana, estabelece as respectivas regras de acondicionamento e rotulagem. O presente decreto-lei não se aplica à mistura de água e ácido acético, a qual não pode ser comercializada como vinagre. Entende-se por vinagre o produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola.

Segundo o Decreto-Lei n.º 174/2007, os vinagres classificam-se de acordo com a Tabela 2.4.

**Tabela 2.4 - Tipos de vinagres.**

<b>Tipo</b>	<b>Definição</b>
Vinagre de vinho	o vinagre obtido exclusivamente do vinho pelo processo biológico de fermentação acética
Vinagre de fruta	o vinagre obtido da fruta ou bagas de fruta pelo processo biológico de fermentação alcoólica e acética
Vinagre de sidra	o vinagre obtido da sidra pelo processo biológico de fermentação acética
Vinagre de álcool	o vinagre obtido do álcool destilado de origem agrícola pelo processo biológico de fermentação acética
Vinagre de cereais	vinagre obtido, sem destilação intermédia, pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de cereais cujo amido tenha sido convertido em açúcares pela diastase de cevada maltada ou por qualquer outro processo
Vinagre de malte	vinagre obtido, sem destilação intermédia, pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de cevada maltada com ou sem a adição de cereais, cujo amido foi convertido em açúcares unicamente pelo processo de cevada maltada
Vinagre de malte destilado	vinagre obtido pela destilação do vinagre de malte, sob pressão reduzida, contendo apenas os constituintes voláteis do vinagre de malte de que deriva
Outros vinagres	vinagres de outros produtos de origem agrícola de dupla fermentação não contemplados nas alíneas anteriores, designadamente de mel, de cerveja, entre outros
Vinagres aromatizados e vinagres com especiarias	os vinagres referidos nas alíneas anteriores aos quais sejam adicionadas plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes, que sejam organoleticamente perceptíveis

Em países, como o Brasil, existe outros tipos de vinagres, como o agrim que é uma mistura de 90% de fermentado acético, obtido do fermentado de álcool, com 10% de fermentado acético, obtido do fermentado alcoólico de vinho branco ou tinto.

Na Itália, existe o vinagre balsâmico, proveniente da região da Modena, é um vinagre especial, original com matéria-prima proveniente da uva de Trebiano com uma mistura do vinagre de vinho aromatizado com açúcar caramelizado, ervas e outros ingredientes. Este tipo de vinagre possui sabor agri-doce devido ao seu processo de envelhecimento e de estocagem em recipiente de madeira, tratando-se, portanto, de um processo de produção semi-industrial (Meneguzzo & Rizzon, 2006).

Os vinagres podem apresentar propriedades que os tornam um produto funcional. Por exemplo, vinagre de sidra de maçã é considerado antioxidante, ele poderá prevenir doenças cancerígenas (por conter beta-caroteno), possui também fibra solúvel (pectina) e por isso ajuda na redução do colesterol. O vinagre de arroz é rico em aminoácidos e ajuda a equilibrar o pH do organismo, também pode ajudar em casos de renite, através de inalações (Budak *et al.*, 2014).

Segundo o Decreto-Lei n.º 174/2007, na preparação de vinagre é permitida a adição de plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes, sumos de fruta ou concentrados de sumo de fruta, mel, açúcar e sal.

É proibida a adição das seguintes substâncias: Aromatizantes artificiais, óleos de grainha de uva, naturais ou artificiais, resíduos de destilação, resíduos de fermentação ou os seus subprodutos, substâncias extraídas de bagaço de todos os tipos, ácidos de todos os tipos, com exceção daqueles naturalmente contidos nas matérias-primas utilizadas ou contidos em qualquer substância cuja adição nestas seja permitida, como sejam, designadamente, os aditivos (Decreto-Lei n.º 174, 2007).

Pelo Decreto-Lei n.º 174/2007, estão definidas as características dos vinagres (Tabela 2.5):

- Aspecto - límpido, podendo admitir-se ligeiro depósito ou turvação.
- Cor, aroma e sabor - próprios da natureza da matéria-prima e dos ingredientes facultativos indicados no rótulo.

O limite do teor de dióxido de enxofre total é indicado no Regulamento (UE) N.º 1129/2011, o valor geral para os vinagres provenientes de origem de vinho ou outras origens, tem um valor máximo de 170 mg/L.

**Tabela 2.5 - Características dos vinagres.**

	<b>Vinagre de vinho</b>	<b>Vinagre de outra origem</b>
<b>Acidez total (g ácido acético/100 mL)</b>	mínimo 6 g/100 mL	mínimo 5 g/100 mL
<b>Álcool residual (em volume, a 20°C)</b>	máximo 1,5%	máximo 0,5%
<b>Dióxido de enxofre total– sulfitos</b>	170 mg/L	170 mg/L

Em Portugal, a fiscalização do cumprimento das normas do presente decreto-lei compete à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), sem prejuízo das competências atribuídas por lei a outras entidades.

## 2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS USADOS PARA TESTAR A AUTENTICIDADE E QUALIDADE

Para avaliar a qualidade e autenticidade dos vinagres, vários países estabeleceram métodos e intervalos de valores aceitáveis ou valores-guia para alguns parâmetros do vinagre, com base nos resultados obtidos na análise de um grande número de amostras autênticas. As diretrizes nacionais e internacionais atuais incluem um maior número de métodos projetados para a identificação e o controle de vinagre em geral do que para questões de autenticidade.

Na Tabela 2.6 estão os principais métodos segundo a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2000).

**Tabela 2.6** - Métodos oficialmente reconhecidos para testar a autenticidade e qualidade do vinagre.

Método	Referência	Técnica	Objetivo
<b>Determinação do teor de acidez total</b>	OENO 52/2000	Neutralização de ácidos na amostra por solução alcalina	Cumprir os requisitos legais (definições, DOP, IGP ...)
<b>Determinação do teor de acidez fixa</b>	OENO 53/2000	Neutralização dos ácidos (não voláteis) do resíduo em solução aquosa utilizando solução alcalina	Cumprir os requisitos legais (definições, DOP, IGP ...)
<b>Determinação do teor de acidez volátil</b>	OENO 54/2000	Cálculo da diferença entre acidez total e acidez fixa, expressa em gramas de ácido acético por L	Cumprir os requisitos legais (definições, DOP, IGP ...)
<b>Deteção e quantificação da presença de ácido acético sintético</b>	OENO 55/2000	Após extrair o ácido acético usando hidróxido de sódio, completar por cintilação líquida a reatividade 14C do produto convertido em benzeno	Autenticação: Valores inferiores aos teores característicos de 14C do ano suposto de produção representam uma mistura com produtos de anos mais recentes ou a adição de todo ou parte do ácido acético sintético
<b>Determinação do teor residual de álcool</b>	OENO 56/2000	Destilação de vinagre, oxidação de etanol por dicromato de potássio e determinação do seu conteúdo titulando o excesso de dicromato de potássio com uma solução de sulfato de ferro e amónio	Cumprir os requisitos legais (definições, DOP, IGP ...)

**Tabela 2.6** - Métodos oficialmente reconhecidos para testar a autenticidade e qualidade do vinagre (continuação).

<b>Método</b>	<b>Referência</b>	<b>Técnica</b>	<b>Objetivo</b>
<b>Determinação do teor total de extrato seco</b>	OENO 57/2000	Evaporação da amostra e secagem em estufa e pesagem	Deteção de fraudes: adição de água ou solução aquosa de ácido acético (valor muito baixo de extrato seco total) ou adição de substâncias não voláteis (valor muito alto de extrato seco total). Banco de dados para o tipo e origem do vinagre é necessário.
<b>Determinação do teor de cinzas</b>	OENO 58/2000	Incineração do extrato de vinagre entre 500°C e 550°C até a combustão completa do carbono	Deteção de fraudes: adição de água ou solução aquosa de ácido acético (teor de cinzas muito baixo) ou adição de substâncias não voláteis (teor de cinzas muito alto). Banco de dados para o tipo e origem do vinagre é necessário.
<b>Determinação do teor de substâncias redutoras não voláteis</b>	OENO 59/2000	Evaporação de substâncias voláteis, hidrólise clorídrica, oxidação por uma solução alcalina de cobre em excesso com titulação por iodometria	Deteção de fraudes: adição de substâncias não voláteis.
<b>Determinação do teor total de dióxido de enxofre</b>	OENO 60/2000 + OENO 13/2008	Titulação iodométrica direta (SO <sub>2</sub> livre) e após hidrólise alcalina dupla (SO <sub>2</sub> combinado)	Controlo do nível de SO <sub>2</sub> e verificação de conformidade com as normas
<b>Determinação do teor total de ácido ascórbico</b>	OENO 61/2000	Oxidação do ácido ascórbico pelo iodo com transformação em ácido desidroascórbico, precipitação com 2,4 - dinitrofenil-hidrazina. Separação por cromatografia em camada fina, solubilização em meio acético e determinação colorimétrica a 500 nm.	Deteção de uso tecnológico fraudulento.

**Tabela 2.6** - Métodos oficialmente reconhecidos para testar a autenticidade e qualidade do vinagre (continuação).

<b>Método</b>	<b>Referência</b>	<b>Técnica</b>	<b>Objetivo</b>
<b>Determinação do teor de sulfatos</b>	OENO 63/2000	Precipitação de sulfatos com cloreto de bário, secagem, calcinação e pesagem	Deteção de fraudes (visando aumentar o extrato seco total)
<b>Determinação do teor de cloretos</b>	OENO 62/2000	Titulação potenciométrica de íons Cl com uma solução de nitrato de prata, em ambiente ácido.	Deteção do aumento fraudulento de extrato seco pela adição de cloreto de sódio
<b>Determinação do teor de cobre</b>	OENO 64/2000	Medição direta por espectrofotometria de absorção atômica.	Contaminação por materiais de contato durante a produção e o ferro do próprio vinho. Conteúdo em excesso pode causar turvação ou alterações sérias na cor.
<b>Determinação do teor de zinco</b>	OENO 65/2000	Medição direta por espectrofotometria de absorção atômica.	A contaminação por materiais de contato durante a produção e o conteúdo excessivo podem causar turvações ou alterações sérias na cor.
<b>Determinação do teor de ferro</b>	OENO 66/2000	Medição direta por espectrofotometria de absorção atômica.	Contaminações de materiais de contato durante a produção e o ferro do próprio vinho. Conteúdo em excesso pode causar turvação ou alterações sérias na cor.
<b>Determinação do teor de chumbo</b>	OENO 67/2000	Medição direta do teor de chumbo no vinagre por espectrometria de absorção atômica sem chama (atomização eletrotérmica).	A presença de chumbo nos vinagres tem origem principalmente nas contaminações de materiais de contato durante a produção e no chumbo do próprio vinho do qual o vinagre foi produzido.
<b>Determinação do teor de mercúrio</b>	OENO 68/2000	Mineralização. Redução por permanganato. Medição por espectrometria de absorção atômica (vapor frio).	Questão de toxicidade

**Tabela 2.6** - Métodos oficialmente reconhecidos para testar a autenticidade e qualidade do vinagre (continuação).

<b>Método</b>	<b>Referência</b>	<b>Técnica</b>	<b>Objetivo</b>
<b>Determinação do teor de acetoína</b>	OENO 69/2000	Neutralização da amostra (pH 7,00) com hidróxido de cálcio. Medição direta da acetoína por cromatografia gasosa	Autenticação: Determinação da qualidade e origem pela análise do teor de acetoína nos vinagres de vinho
<b>Determinação do metanol, álcoois superiores e acetato de etilo</b>	OENO 70/2000	Neutralização da amostra pH 7,00 com uma solução de hidróxido de sódio. Medição, via GC, de alguns componentes voláteis: metanol, propan-1-ol, butan-2-ol, 2metilpropan-1-ol, butan-1-ol e 2metilbutan-1-ol + 3-metilbutan-1ol	Questão organolética e possivelmente toxicológica
<b>Autenticidade por SNIFNMR® e outros métodos isotópicos</b>	OENO 71/2000	Extração do ácido acético do vinagre com éter. Purificação usando uma coluna Cadiot. Determinação da pureza do ácido acético. Medição da razão deutério/hidrogénio específica do local no ácido acético resultante, via RMN de deutério.	Deteção de fraudes: deteção de ácido acético sintético em vinagres e qualquer outra desclassificação de vinagres. Deteção de possível adição de álcool-vinagre proveniente de plantas cujo metabolismo é C4 (adição de açúcar da cana) ou C3 (beterraba)
<b>Determinação de ácido acético sintético em vinagres de vinho pela determinação da radioatividade <math>\beta</math> de <math>^{14}\text{C}</math> de ácido acético por cintilação líquida</b>	OENO 12/2006	Extração de ácido acético do vinagre.	Deteção de fraude: deteção da adição de ácido acético sintético
<b>Método para determinação da razão isotópica <math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math> do ácido acético no vinagre de vinho</b>	OIV-OENO 510-2013	Razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de ácido acético por espectrometria de massa com razão isotópica (IRMS)	Deteção de fraudes relacionadas com a origem botânica do ácido acético obtido e revelação da adição de ácido acético sintético.



**Tabela 2.6** - Métodos oficialmente reconhecidos para testar a autenticidade e qualidade do vinagre (continuação).

<b>Método</b>	<b>Referência</b>	<b>Técnica</b>	<b>Objetivo</b>
<b>Método para determinação da razão isotópica <math>^{18}\text{O}/^{16}\text{O}</math> da água no vinagre de vinho usando espectrometria de massa isotópica</b>	OIV-OENO 511-2013	Razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água por Espectrometria de Massa com Razão Isotópica (IRMS)	Deteção de fraudes relacionadas com a produção de vinagres de uvas frescas ou de uvas secas com adição de água
<b>Determinação da distribuição de deutério no ácido acético de vinagre por ressonância magnética nuclear (RMN)</b>	OIV-OENO 527-2015	Razão isotópica, RMN de $^1\text{H}$ composto e RMN de $^2\text{H}$ -SNIF	Deteção de fraudes sobre a origem botânica do ácido acético e da adição de ácido acético sintético
<b>Análise isotópica de ácido acético e água</b>			
<b>Parte 1: análise de <math>^2\text{H}</math>-RMN do ácido acético.</b>	CEN, EN 164661,2,3 (2012)	SNIF-RMN (D/H),	Determinação de fraudes relacionadas com o ácido acético de vinagre, adição de água e açúcar (beterraba, cana)
<b>Parte 2: análise <math>^{13}\text{C}</math>-IRMS do ácido acético.</b>		$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ IRMS,	
<b>Parte 3: análise <math>^{18}\text{O}</math>-IRMS da água no vinagre de vinho</b>		$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ IRMS	

## 2.5 SITE SPECIFIC NATURAL ISOTOPIC FRACTIONATION STUDIED BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

A Ressonância Magnética Nuclear pode contribuir significativamente para a determinação da autenticidade quanto à origem geográfica e/ou biossintética dos alimentos, através das medidas da relação isotópica,  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , em abundância natural, para sítios moleculares específicos. Esta verificação é feita empregando-se uma técnica conhecida como SNIF-NMR, que foi desenvolvida para detetar a adição de hidratos de carbono não declarados no vinho, com o objetivo de aumentar o seu teor alcoólico, num processo que é chamado de enriquecimento ou *chaptalization* (Boffo, 2009).

Os átomos existem como isótopos diferentes. O açúcar na beterraba, por exemplo, provém de uma via bioquímica diferente do açúcar nas uvas e, portanto, contém proporções diferentes de isótopos de hidrogénio ( $^1\text{H}$  e  $^2\text{H}$ ). O SNIF-NMR pode medir as diferentes proporções de isótopos de hidrogénio em cada posição de uma molécula, identificando assim a adição de açúcar de outra fonte (Eurofins, 2019).

A técnica SNIF-NMR permite a quantificação, com precisão muito fina, de proporções isotópicas através de uma molécula. Vários são os fatores que os afetam, incluindo origem botânica, clima e geografia e, portanto, a impressão digital isotópica resultante fornece informações detalhadas sobre a origem da molécula (Eurofins, 2019).

### 2.5.1 Determinação das razões isotópicas no sítio específico

Segundo Ashurst & Dennis (1998), a distribuição isotópica é definida em termos da abundância isotópica, A, ou razão isotópica, R.

$$R = \frac{\text{pesado}}{\text{leve}} \quad \text{ou} \quad A = \frac{\text{pesado}}{\text{pesado} + \text{leve}}$$

Para o caso do deutério, a razão do sítio específico representa o número de átomos de deutério ( $^2\text{H}$  ou D) para o número de protões ( $^1\text{H}$ ) no sítio específico. Sendo o D o pesado; e H o leve.

$$R = \left( \frac{D}{H} \right)$$

As razões  $(^2\text{H}/^1\text{H})_i$  e  $(^2\text{H}/^1\text{H})_{II}$ , associadas aos sítios metílico (I) e metilénico (II) do ácido acético, são medidas por RMN utilizando-se um padrão de conteúdo isotópico conhecido e segundo Boffo (2009), podem ser calculados com base na seguinte expressão matemática:

$$\left( \frac{^2\text{H}}{^1\text{H}} \right)_i^A = \frac{I_i^A}{I^P} * \frac{P^P}{P_i^A} * \frac{m^P}{m^A} * \frac{M^A}{M^P} \left( \frac{^2\text{H}}{^1\text{H}} \right)^P$$

Em que:

$(^2\text{H}/^1\text{H})_i^A$  : Relação isotópica no sítio i do composto de estudo, A.

$(^2\text{H}/^1\text{H})^P$  : Relação isotópica do padrão.

$I^P$  e  $I_i^A$  : Área dos sinais de RMN de  $^2\text{H}$  do padrão e do sítio i de A, respectivamente.

$P^P$  e  $P_i^A$  : Número de hidrogénios do padrão e do sítio i de A, respectivamente.

$m^P$  e  $m^A$  : Massa do padrão e de A, respectivamente.

$M^P$  e  $M^A$  : Massa molar do padrão e de A, respectivamente.

A N,N-tetrametiluréia (TMU) é utilizada como o padrão interno. De acordo com Boffo (2004), é um excelente solvente para dissolução de substâncias orgânicas, devido a características como: no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , apresenta um único singlete, tem uma massa molar relativamente alta, é quimicamente inerte ao solvente e à amostra.

## 2.6 FOTOSSÍNTESE

Para entender o que está subjacente à técnica de SNIF-NMR e como através dela é possível encontrar a origem biossintética de um produto, como a origem de um vinagre, é necessário entender os mecanismos biossintéticos, como a fotossíntese.

A fotossíntese é um processo biossintético em que ocorre a formação de compostos orgânicos em meio biológico.

Na fotossíntese a água é o doador de electrões, e há um transportador intermediário de  $\text{H}^+$ , a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ( $\text{NADP}^+$ ). A fotossíntese ocorre com muitas etapas, e as suas reações são divididas em duas vias principais (Sadava *et al.*, 2019):

- Reações fotoquímicas: convertem energia luminosa em energia química na forma de ATP e o transportador de electrões reduzido NADPH.
- Reações de carboxilação: reações de fixação do carbono, não utilizam a luz diretamente, em vez disso, utilizam ATP, NADPH e  $\text{CO}_2$  para produzir hidratos de carbono. Por meio dessas reações o carbono inorgânico é assimilado em compostos orgânicos.

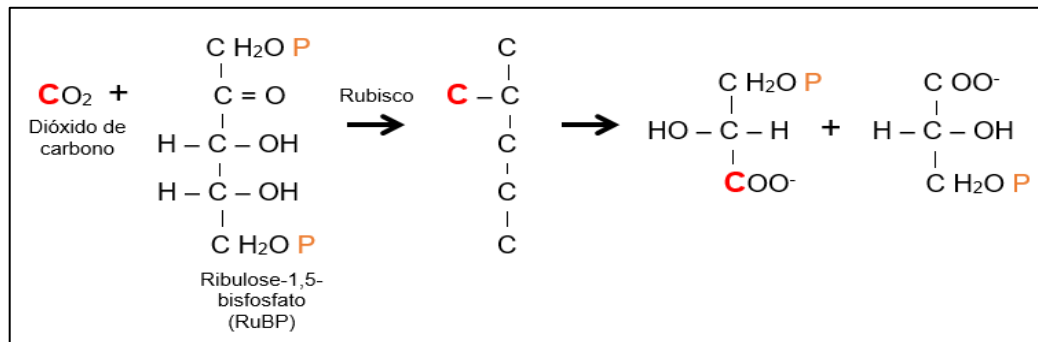
A importância da utilização da etapa da fotossíntese vem do  $\text{CO}_2$  absorvido pela planta. A forma como essa fixação é feita irá diferenciar o tipo de planta e assim através de análise por SNIF-RMN, será possível a identificação da origem biossintética da planta.

### 2.6.1 Fixação do Carbono em Plantas $\text{C}_3$

Uma planta "normal" que não tenha adaptações fotossintéticas para reduzir a fotorrespiração é chamada de planta  $\text{C}_3$ . A primeira etapa do Ciclo de Calvin é a fixação do dióxido de carbono pela rubisco, e as plantas que usam apenas este mecanismo "padrão" de fixação do carbono são chamadas de plantas  $\text{C}_3$ , assim denominadas devido ao composto de três carbonos (3-PGA) produzido pela reação (Reece *et al.*, 2011).

O trabalho desenvolvido por Calvin e seus colaboradores, utilizando exposições sucessivas de  $^{14}\text{CO}_2$ , permitiu seguir o  $^{14}\text{C}$  à medida que ele se "move" por uma série de compostos. Verificou-se que o  $^{14}\text{C}$  move-se por uma via cíclica. Neste ciclo, o  $\text{CO}_2$  liga-se covalentemente a uma molécula de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) de cinco carbonos. O intermediário resultante de seis carbonos

rapidamente se divide em duas moléculas de três carbonos (Figura 2.6). O ciclo repete-se e são produzidas moléculas de hidratos de carbono. Essa via foi denominada de ciclo de Calvin.

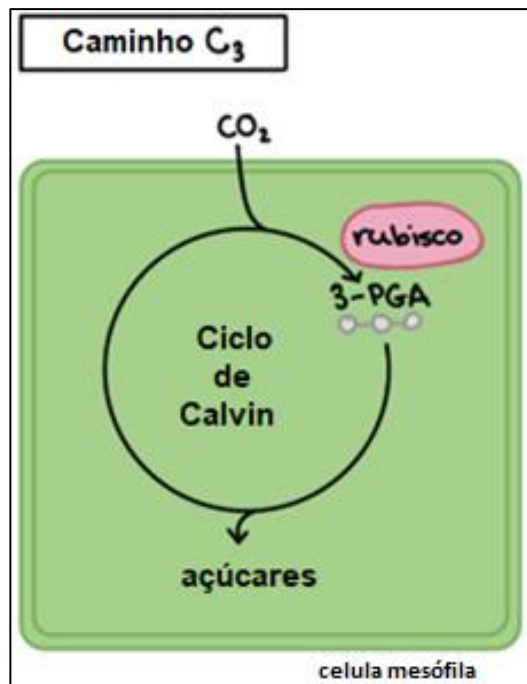


**Figura 2.6** - Destino do átomo de carbono no  $\text{CO}_2$ .

Conforme Sadava *et al.* (2019), a enzima catalisadora, rubisco (ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase), é a proteína mais abundante do mundo, constitui até 50% de toda a proteína em cada folha de uma planta e é uma enzima envolvida na primeira etapa principal da fixação de carbono.

O ciclo de Calvin (Figura 2.7) usa o ATP e o NADPH para reduzir o  $\text{CO}_2$  a hidrato de carbono. Este ciclo é composto por três processos distintos:

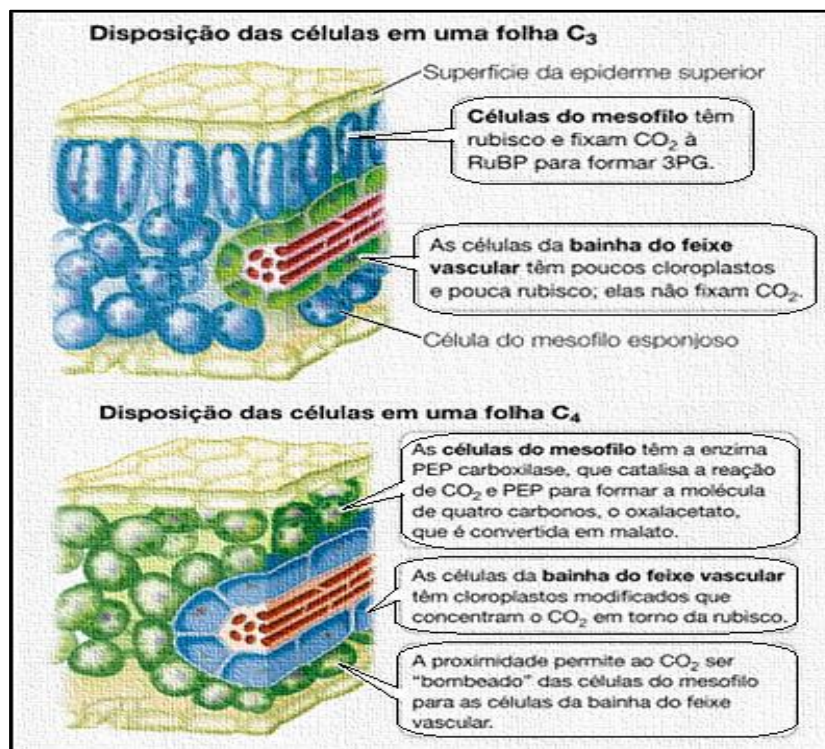
- **Fixação do  $\text{CO}_2$ :** O dióxido de carbono e a água são combinados com moléculas de ribulose 1,5-bifosfato (que ajudam na fixação do carbono) obtendo-se 3-fosfoglicerato (3PG).
- **Redução do 3PG:** para formar gliceraldeído-3-fosfato (G3P).
- **Regeneração do  $\text{CO}_2$ , RuBP.** A maior parte do G3P acaba como ribulose monofosfato (RuMP), e o ATP é usado para converter esse composto em RuBP. Assim por cada ciclo, um  $\text{CO}_2$  é fixado e um  $\text{CO}_2$  é regenerado.



**Figura 2.7** - Representação esquemática do ciclo de Calvin (Adaptado de Khan Academy, 2020).

Seis ciclos produzem o equivalente a uma molécula de glicose, uma hexose.

Em plantas C<sub>3</sub>, como o trigo e arroz, o primeiro produto é a molécula 3PG de três carbonos. Nessas plantas, as células do mesófilo, que constituem o corpo principal da folha, estão preenchidas com cloroplastos contendo rubisco (Figura 2.8). Num dia quente, essas folhas fecham os seus estômatos para conservar água.



**Figura 2.8** - Anatomia foliar de plantas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>. (Adaptado de Sadava et al., 2019).

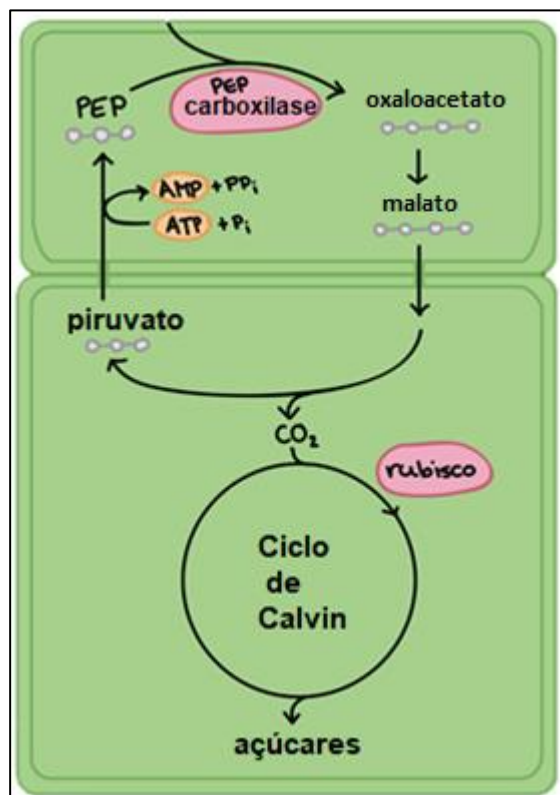
As plantas  $C_4$ , como o milho e a cana-de-açúcar, produzem a molécula de oxaloacetato de quatro carbonos, como primeiro produto de fixação do  $CO_2$  (Figura 2.8). Num dia quente, elas fecham parcialmente os seus estômatos para conservar água, não se observando redução nas suas taxas fotossintéticas.

## 2.6.2 Fixação do Carbono em Plantas $C_4$

As plantas  $C_4$  são plantas que evoluíram para evitar a fotorrespiração sob condições quentes e secas, enquanto as plantas  $C_3$  não.

Segundo Boffo (2004), a fixação de  $CO_2$  ocorre nas células mesofílicas, onde o  $CO_2$  é adicionado ao ácido fosfoenolpirúvico, via a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcarboxilase), para formar o ácido oxaloacético. Este ácido pode ser reduzido a ácido málico com a utilização de NADPH, ou transformado em ácido aspártico, por uma reação de aminação.

Em seguida o ácido málico será descarboxilado libertando o  $CO_2$  e produzindo ácido pirúvico. O  $CO_2$  libertado é refixado via o ciclo de Calvin (Figura 2.9) e o ácido pirúvico resultante volta às células mesofílicas onde é convertido em ácido fosfoenolpirúvico, regenerando o aceitador inicial de  $CO_2$ .

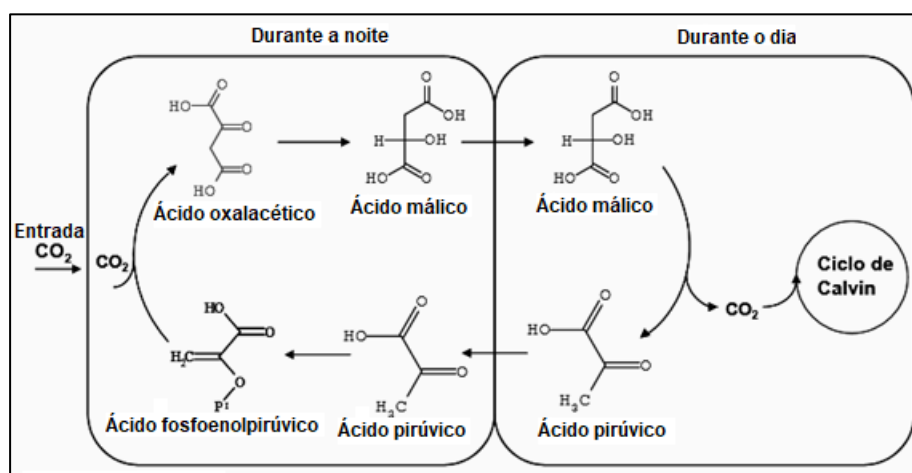


**Figura 2.9** - Representação esquemática do ciclo  $C_4$ . (Adaptado de Khan Academy, 2020).

### 2.6.3 Fixação do Carbono em Plantas CAM

A fixação do carbono em planta CAM (Figura 2.10) é uma adaptação ao ambiente árido, onde os vegetais ficam expostos a uma grande luminosidade e estresse hídrico. Essas plantas possuem a capacidade de abrirem seus estômatos à noite e fechá-los durante o dia, reduzindo significativamente a perda excessiva de água e CO<sub>2</sub>. Em épocas de estiagem, algumas dessas plantas são capazes de manter os seus estômatos fechados durante todos os períodos do dia (Santos, 2020).

Segundo Sadava *et al.* (2019), as plantas CAM também usam PEP carboxilase. Em tais plantas incluem-se algumas que armazenam água (denominadas suculentas) da família *Crassulaceae*, muitos cactos, ananás e vários outros grupos de plantas floríferas. O metabolismo do CO<sub>2</sub> dessas plantas denomina-se metabolismo ácido das crassuláceas CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*). Esse mecanismo assemelha-se muito ao metabolismo de plantas C<sub>4</sub>, uma vez que o CO<sub>2</sub> é inicialmente fixado em compostos de quatro carbonos. Em plantas CAM, no entanto, os processos de fixação inicial de CO<sub>2</sub> e o ciclo de Calvin separam-se no tempo e não no espaço.



**Figura 2.10** - Representação esquemática do ciclo CAM (Adaptado de Boffo, 2004).

## 2.7 IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

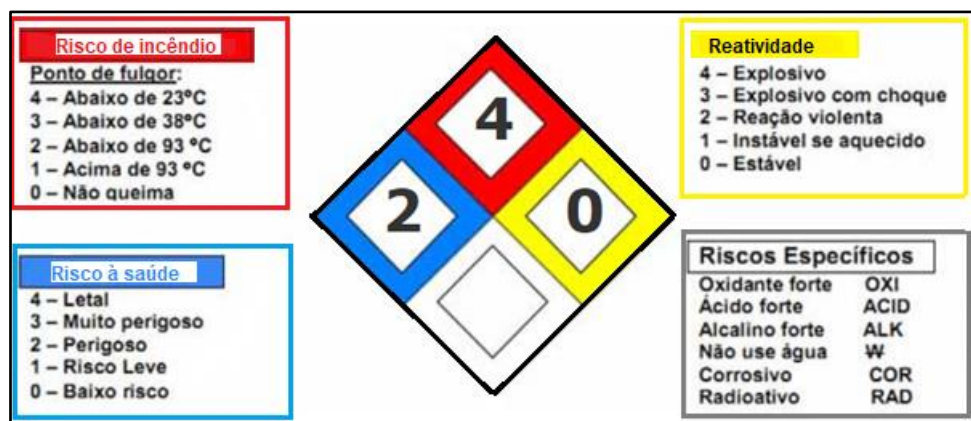
Os reagentes manuseados durante a realização dos ensaios referidos neste trabalho apresentam alguns perigos que devem ser conhecidos e considerados durante a sua utilização. As fichas de segurança dos reagentes manuseados apresentam também pictogramas de perigo que advertem sobre a utilização, manuseamento, riscos para a saúde e ambiente.

Um pictograma de perigo é uma imagem existente num rótulo que contém um símbolo de aviso e cores específicas e destina-se a transmitir informações sobre os efeitos nocivos que uma determinada substância ou mistura pode ter na nossa saúde ou no ambiente (ECHA, 2020).

O diagrama de *Hommel* (Figura 2.11), como representação gráfica é um sistema de marcações simples, facilmente reconhecido e compreensível. É comumente chamado de "diamante de risco da NFPA", e fornece uma percepção geral imediata dos perigos de um material e a gravidade dos riscos,

no que se refere as respostas de emergências. A simbologia usada pela Associação Nacional para Proteção contra Incêndios dos Estados Unidos da América (NFPA, 2020).

No diagrama são representados losangos que expressam tipos de risco em graus que variam de 0 a 4, cada qual especificado por uma cor (branco, azul, amarelo e vermelho), que representam, respectivamente, riscos específicos, risco à saúde, reatividade e inflamabilidade (UNESP, 2020).



**Figura 2.11** - Diagrama de Hommel do Acetato de Etilo.  
(Adaptado de UNESP, 2020).

No desenvolvimento da preparação das amostras para a técnica de SNIF-RMN foram utilizadas algumas substâncias como solventes na fase de extração. Os seus perigos foram estudados não só por motivos de segurança mas também para auxiliar na seleção do melhor solvente a utilizar face ao objetivo traçado.



### 2.7.1 Éter Etílico

O éter etílico é considerado um produto com baixa toxicidade. O maior risco é de incêndio e explosão por ser um líquido inflamável e muito volátil. A exposição a vapores de éter etílico durante muito tempo causa embriaguez, levando à inconsciência. Embora a toxicidade do éter etílico seja baixa, se inalado ou em contato com a pele ou olhos causa irritação e queimaduras. Se inalado em pequenas quantidades provoca irritação no trato respiratório e provoca tonturas (IMBEL, 2009). O pictograma com uma chama significa que o composto é inflamável. Enquanto o pictograma com o ponto de exclamação significa que o composto tem toxicidade aguda, sensibilizante dérmico. Na Figura 2.12 estão os pictogramas e Diamante de risco do éter etílico.

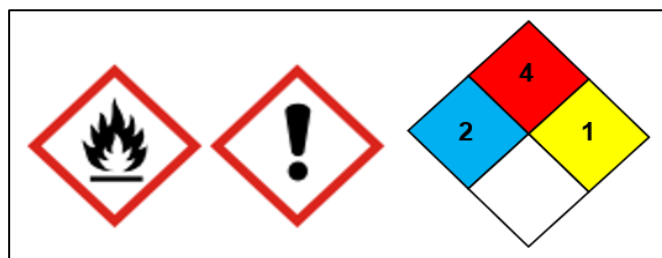


Figura 2.12 - Riscos do éter etílico.

### 2.7.2 Acetato de Etilo

Líquido e vapores altamente inflamáveis. Provoca irritação ocular grave. Pode provocar sonolência ou vertigem. Pode provocar secura da pele ou fissuras por exposição repetida. Manter afastado do calor, faísca, chama aberta, superfícies quentes (Merck, 2019). Na Figura 2.13 estão os pictogramas e Diamante de risco do acetato de etilo.

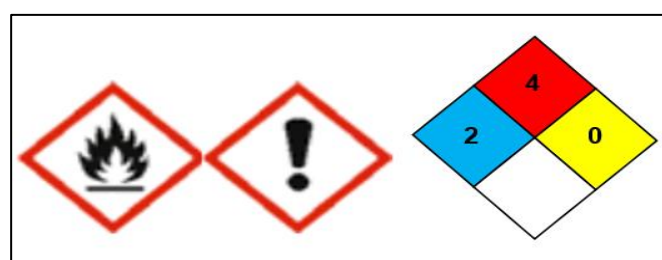


Figura 2.13 - Riscos do acetato de etilo.

### 2.7.3 Ácido Acético

Produto corrosivo. Líquido e vapores inflamáveis. Provoca queimadura severa na pele e dano nos olhos. Os vapores causam irritação do trato respiratório, com tosse e desconforto no peito. Pode ocorrer perda dos sentidos. Podem ocorrer náuseas, vômitos, fraqueza e falta de coordenação. Altas concentrações de vapor podem causar dor de cabeça e sonolência. Nocivo em contato com a pele (SuperQuímica, 2012). Na Figura 2.14 estão os pictogramas e Diamante de risco do ácido acético. O segundo pictograma da Figura 2.14 significa que o composto é corrosivo.

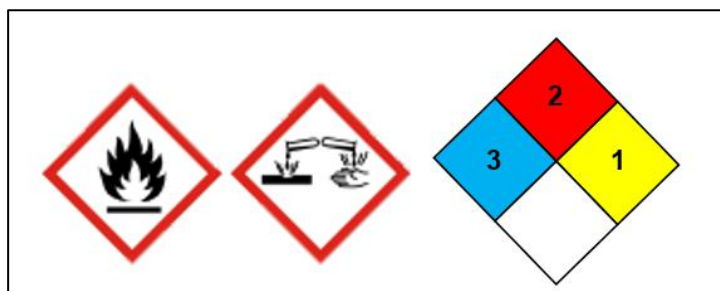


Figura 2.14 - Riscos do ácido acético.

### 2.7.4 Hidróxido de sódio (Lentilhas, PA)

Produto corrosivo para metais, provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Reage de forma exotérmica com a água. Na Figura 2.15 estão o pictograma e Diamante de risco do hidróxido de sódio (Carloth, 2020).

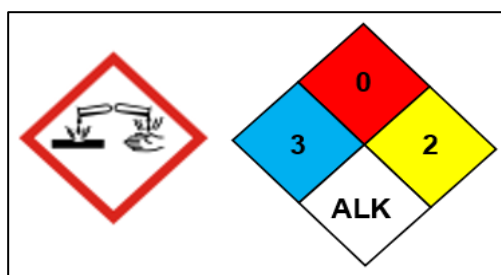


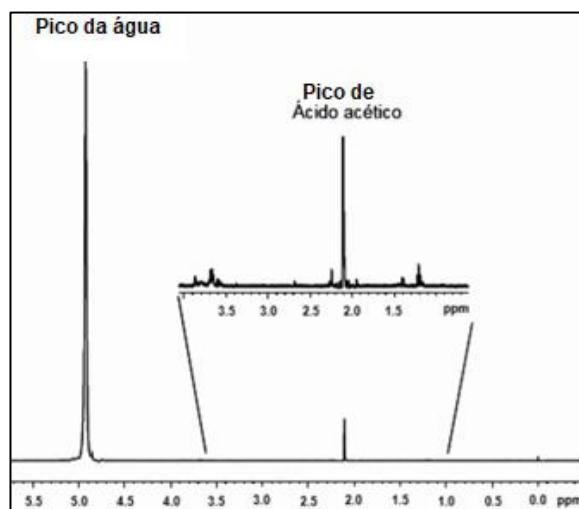
Figura 2.15 - Riscos do hidróxido de sódio.

## 2.8 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

### 2.8.1 Extração do ácido acético

Na utilização da técnica por SNIF-RMN é necessária uma preparação prévia da amostra, para aumentar a concentração do ácido acético (Boffo, 2004). Devido à grande quantidade de água presente na amostra quando se adquire os espectros de RMN sem extração, verifica-se a presença de um sinal muito intenso, referente à água, em relação aos sinais de interesse, como pode ser observado na Figura 2.16.

Outros pesquisadores forneceram resultados usando o SNIF-RMN (Vallet *et al.*, 1998; Hermann, 2001; Boffo, 2004; Vignali *et al.*, 2007; Freddy & Eric, 2009) revelando que aumentar a pureza do ácido acético antes da aquisição por SNIF-RMN, era um passo muito importante para a sua quantificação utilizando esta técnica.



**Figura 2.16** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H de um vinagre sem supressão do sinal do solvente. (Adaptado de Boffo, 2004).

A destilação azeotrópica, por membrana e extrativa são métodos eficazes para aumentar a concentração de ácido acético (Saha *et al.*, 2000). No entanto, a destilação azeotrópica consome muita energia e a destilação por membrana requer um custo fixo alto.

Segundo Ko *et al.* (2013) estudaram um método de extração otimizado de ácido acético em vinagre e o seu efeito na análise por SNIF-RMN para controlar a autenticidade do vinagre. Avaliaram a pureza do ácido acético na preparação da amostra utilizando um projeto experimental de matriz ortogonal para determinar as condições ideais de extração, discutindo a influência dos solventes do extrato e da concentração da amostra nos valores de (D/H)<sub>CH<sub>3</sub></sub> calculados a partir dos resultados de RMN. O tempo de extração, o número de extrações e a proporção solvente/amostra foram definidos como fatores para uma série de combinações experimentais. Na preparação da amostra, utilizaram uma amostra de vinagre sintético com 5% (v/v) de ácido acético misturada com água desionizada. Após a filtração da amostra, foi adicionado o solvente e foi efetuada a extração em agitador contínuo com vibração, a temperatura constante. Foram repetidas as etapas de extração sucessiva até otimização

do processo extrativo. A fase orgânica obtida foi ainda extraída em extrator *Soxhlet* para separação do extrato e do solvente.

Os tempos de extração (fator A) foram 5, 15 e 25 min; os números de extrações foram (fator B) 1, 4 e 7; e as proporções amostra-solvente da extração foram (fator C) 1:2 (0,5), 3:4 (0,75) e 1:1 (1). Esses procedimentos também foram testados com dois solventes diferentes o acetato de etilo e éter dietílico. A Tabela 2.7 mostra os resultados das experiências para a extração de vinagre, segundo Ko *et al.* (2013).

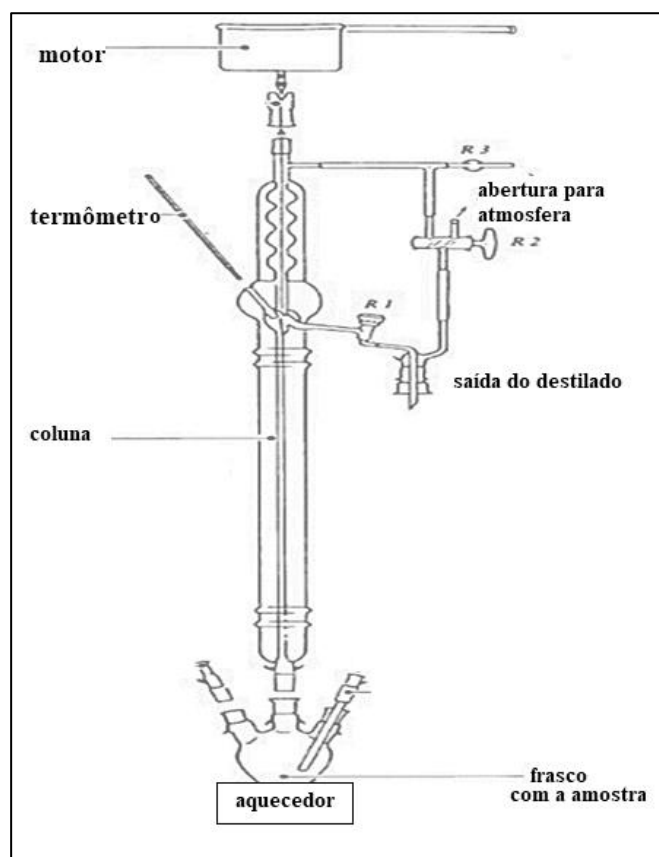
**Tabela 2.7** - Otimização do processo extrativo com acetato de etilo e éter dietílico.

Ensaio	Fatores			Taxa de Extração (%)	
	A (min)	B (vezes)	C (razão)	Acetato de etilo	Éter dietílico
1	5	1	0,50	20,64	10,58
2	5	4	0,75	59,21	36,60
3	5	7	1,00	85,31	52,53
4	15	1	1,00	46,44	34,50
5	15	4	0,50	58,67	42,65
6	15	7	0,75	85,13	68,45
7	25	1	0,75	42,69	30,43
8	25	4	1,00	84,41	64,05
9	25	7	0,50	67,41	54,23

As taxas de extração foram maiores para as amostras de vinagre com acetato de etilo do que para as amostras de vinagre com éter dietílico. A maior taxa de extração obtida com as amostras de vinagre com acetato de etilo foi de 85,31%. Além disso, as taxas de extração aumentaram quando a proporção amostra/solvente foi aumentada. A taxa máxima de extração de 85,31% para acetato de etilo envolve um tempo de extração de 5 min, sete extrações e uma proporção de amostra para solvente de 1:1.

## 2.8.2 Purificação do ácido acético

Após a extração do ácido acético as amostras são concentradas através de uma destilação utilizando coluna de *Cadiot* (Figura 2.17). Após a destilação, fez-se a titulação da amostra e calculou-se a concentração do ácido acético em g/L.



**Figura 2.17** - Diagrama do dispositivo de destilação com coluna de Cadiot. (Adaptado de OENO 510-2013, 2013).

A Tabela 2.8 mostra a taxa de extração nas amostras de vinagre, sendo a concentração de ácido acético e a razão  $(D/H)_{CH_3}$  para a extração de acetato de etilo e éter dietílico do ácido acético após a destilação.

**Tabela 2.8** - Concentração de ácido acético e valor de  $(D/H)_{CH_3}$  pelo método de destilação extrativa com acetato de etilo e éter dietílico (Adaptado de Ko et al., 2013).

Condições para a extração com Acetato de etilo			
	$A_2B_1C_3$	$A_2B_2C_3$	$A_2B_3C_3$
Taxa de extração (%)	46,44	82,76	93,65
Concentração (g/100 mL)	33,52	34,14	33,86
$(D/H)_{CH_3}$ (ppm)	133,83	133,67	134,27
Condições para a extração com Éter dietílico			
	$A_2B_1C_3$	$A_2B_2C_3$	$A_2B_3C_3$
Taxa de extração (%)	34,50	63,48	80,57
Concentração (g/100 mL)	51,62	51,76	51,58
$(D/H)_{CH_3}$ (ppm)	131,43	131,57	131,53

De acordo com os estudos de Ko *et al.* (2013), após a destilação, a concentração de ácido acético extraído com acetato de etilo aumentou cerca de seis vezes, de 50 para 335,2-341,4 g/L. Da mesma forma, a concentração de ácido acético extraído com éter dietílico aumentou dez vezes de 50 para 515,8–517,6 g/L. A taxa de extração e as concentrações de ácido acético foram maiores nas amostras extraídas com acetato de etilo do que nas amostras extraídas com éter dietílico.

A mistura binária de ácido acético e água não forma um azeótropo. Apesar disso, a obtenção de ácido acético puro (com ponto de ebulição 118,1 °C) a partir de uma solução de ácido acético e água por destilação é muito difícil. De facto, à medida que as destilações progressivas produzem soluções com menos e menos água, cada destilação adicional é menos eficaz na remoção da água restante.

Destilar a solução de ácido acético glacial é, portanto, economicamente impraticável. O acetato de etilo forma um azeótropo positivo com água que ferve a 70,4 °C (com composição azeotrópica 35,9% em água e 64,1% em acetato de etilo).

Ao adicionar acetato de etilo como um arrastador, é possível evaporar o azeótropo e obter ácido acético puro como resíduo (Bellagi *et al.*, 2015).

### 2.8.3 Efeito da concentração de ácido acético

Segundo Boffo (2004), a adulteração de vinhos e sumos de frutas pode ser realizada adicionando-se açúcares derivados da beterraba, que utiliza o mesmo ciclo metabólico que a videira, a laranjeira entre outros, tornando-se impossível a detecção da origem do açúcar adicionado utilizando somente a EM de  $^{13}\text{C}$ , uma vez que os valores da relação isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  para o etanol obtido a partir da beterraba, do vinho e sumo de frutas são muitos próximos. A técnica RMN pode ser utilizada não somente para detetar esse açúcar adicionado, como também para quantificá-lo, pois o etanol obtido de cada um desses açúcares apresenta valores distintos para a relação  $^2\text{H}/^1\text{H}$ .

No estudo de Hsieh *et al.* (2013) o método SNIF-NMR foi utilizado para identificar a adulteração do vinagre de melão por ácido acético no vinagre de arroz. Os valores  $(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$  encontrados foram para vinagre de arroz de 98,50 ppm, no vinagre de melão 108,46 ppm e para o vinagre sintético 131,58 ppm. No teste do modelo, os resultados mostraram que a relação  $(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$  aumenta com a adição de vinagre de melão ou vinagre sintético, e que existe uma boa correlação linear ( $R^2 > 0,97$ ). Com os resultados obtidos, o método SNIF-RMN mostrou-se eficaz de determinar o grau de adulteração no vinagre.

No trabalho de Hermann (2001), determinou-se a razão isotópica D/H do ácido acético de vinagres e produtos em conserva por espectroscopia de H-NMR. A Tabela 2.9 apresenta uma média de intervalo da relação isotópica  $^2\text{H}/^1\text{H}$  de acordo com o composto do vinagre. Exemplos de plantas C3 são cereais de grão de arroz, trigo, soja; árvores como maçã, eucalipto. Já plantas como milho e cana são exemplos de plantas C4. O abacaxi é uma planta CAM.

**Tabela 2.9** - Relação isotópica  $^2\text{H}/^1\text{H}$  por composto.

Composto	Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)
C3	90 – 100
C4	110
CAM	105
Ácido acético sintético	130-140

(Adaptado de Hermann, 2001)

De acordo com os valores de  $(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$  obtidos, estes foram semelhantes quando as concentrações de ácido acético eram maiores ou iguais à 500 g/L, mas diferiram quando a concentração de ácido acético era menor ou igual à 250 g/L (Tabela 2.10). A flutuação nos valores de  $(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$  observada para baixas concentrações de ácido acético foram atribuídas ao facto das concentrações se encontrarem abaixo do limite de detecção do NMR (Ko *et al.*, 2013).

**Tabela 2.10** - Efeito da concentração de ácido acético no valor de  $(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$ .

Concentração de ácido acético (g/L)	999	750	500	250	150	50
Média $(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$ (ppm)	131,62	131,43	131,54	134,06	147,42	93,75

## 2.9 CROMATOGRAFIA GASOSA

As técnicas cromatográficas têm sido amplamente aplicadas, para determinar certos compostos de vinagre úteis para caracterizar, classificar ou detetar a adulteração em vinagres (Callejón *et al.*, 2015).

A etimologia da palavra cromatografia, como foi primeiramente empregada, é definida pelos termos de origem grega a partir das palavras *chroma* e *graphe*, que significam cor e escrever, respectivamente, cujo sentido seria algo como “escrita das cores” (Zanão, 2019).

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica que permite a separação de substâncias voláteis arrastadas por um gás através de uma fase estacionária. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido que propicia a distribuição dos componentes da mistura entre as duas fases através de processos físicos e químicos, tais como a adsorção, diferenças de solubilidades, volatilidades ou troca. Como fase móvel é utilizado um gás, denominado gás de arraste, que transporta a amostra através da coluna cromatográfica até ao detetor onde os componentes separados são detetados. Os gases mais utilizados são o hidrogénio, azoto, hélio e argon (PLVPQ, 2020).

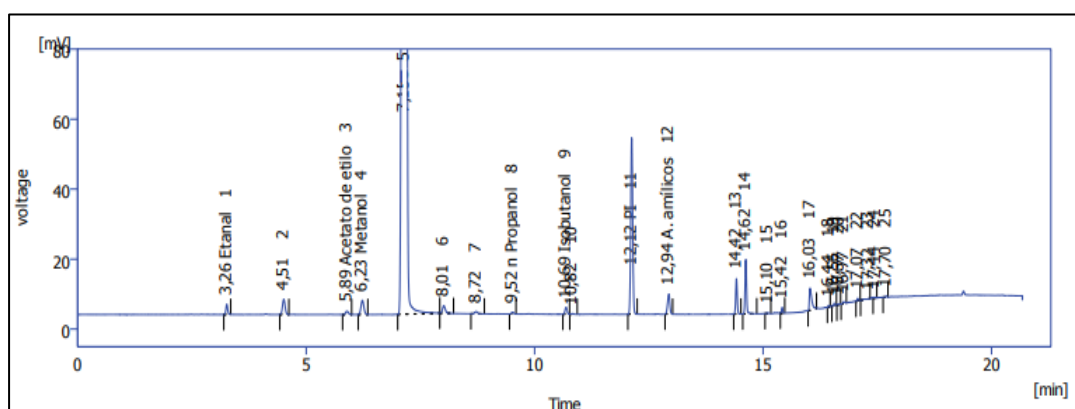
Os compostos da amostra têm afinidades diferentes com a fase estacionária. Quando a força de interação entre o composto e a fase estacionária é forte, este será fortemente retido na coluna, tendo uma mobilidade menor na fase móvel. Por outro lado, os compostos da amostra que apresentam pouca afinidade com a fase estacionária, terão maior mobilidade na fase móvel. Desta forma os vários constituintes da amostra circulam a velocidades diferentes ocorrendo a sua separação. A separação é baseada nas propriedades moleculares dos compostos, como o tamanho ou a polaridade (Marques, 2019).

À medida que os compostos são separados e detetados vão dar origem a uma série de sinais em função do tempo que são representados graficamente sob a forma de um cromatograma. Cada um dos sinais representa a distribuição de um componente eluído na fase móvel (Marques, 2019).

A coluna pode ser considerada o componente mais importante não só do instrumento da CG, mas de toda a técnica cromatográfica, pois é no seu interior, que contém uma fase estacionária, que de facto ocorre a separação dos componentes na mistura. Basicamente, as colunas podem ser classificadas em duas categorias mais amplas, as colunas empacotadas e as capilares (Zanão, 2019).

O tempo de retenção ( $t_R$ ) de um composto é o tempo que decorre desde a sua injeção no sistema até ao momento que é detetado. Este é característico para um dado composto desde que as condições cromatográficas permaneçam inalteradas (coluna, fase móvel, temperatura). O tempo de retenção está fortemente correlacionado com as propriedades físico-químicas de um analito fornecendo informações qualitativas (Nagy & Vékey, 2008).

O cromatograma (Figura 2.18) é o gráfico que traduz os resultados da análise cromatográfica, possibilitando assim a identificação dos componentes da mistura. Neste gráfico, cada substância é representada por picos. O número de picos depende do tipo de sistema cromatográfico, da finalidade do experimento, como também da complexidade da amostra (Azambuja, 2017).



**Figura 2.18** - Cromatograma de uma amostra de vinagre.

Na cromatografia gasosa é comum a identificação de compostos por meio da comparação do tempo de retenção do analito com o tempo de retenção de um composto padrão (Vieira, 2019).





### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ DO VINAGRE**

A acidez total corresponde ao teor de ácido acético que é o componente mais importante do vinagre. Ele provém da oxidação do álcool do vinho no processo de acetificação (Embrapa, 2006).

De acordo com a OENO 52-2000, resolução da Organização Internacional da Vinha e do Vinho, a acidez total de um vinagre cuja acidez pode ser titulada na presença de fenolftaleína em solução alcoólica, usada como indicador.

##### **3.1.1 Reagentes e equipamentos**

Solução de hidróxido de sódio 0,5 M; Indicador: solução alcoólica de fenolftaleína 1% (v/v); Material e equipamento corrente de laboratório.

##### **3.1.2 Técnica**

Num balão cônico de 100 mL, adicionou-se 10 mL da amostra. Adicionou-se água destilada até a diluição da cor e 4 gotas do indicador. Titulou-se com a solução de hidróxido de sódio 0,5 M até obter uma cor rosa persistente.

Considerando:  $V$  o volume em mL da solução de hidróxido de sódio utilizado na titulação. O teor de acidez total expresso em gramas de ácido acético por litro de amostra será dado por três vezes este volume:  $3 \times V$

A repetibilidade foi avaliada analisando-se os resultados obtidos na concentração do ácido acético em g/L nas amostras analisadas em duplicado.

#### **3.2 DETERMINAÇÃO DO ÁLCOOL RESIDUAL**

De acordo com a OENO 56-2000, o teor de álcool residual é a percentagem em volume de etanol ainda contida no vinagre após fermentação acética.

Baseia-se na separação do álcool por destilação da amostra e sua posterior quantificação de acordo com a densidade relativa do destilado a 20 °C (BRASIL, 1986).

##### **3.2.1 Reagentes e equipamentos**

Papel de fenolftaleína; Solução de hidróxido de cálcio 120 g/L; Material e equipamento corrente de laboratório.

### 3.2.2 Técnica

Utilizou-se 100 mL de vinagre em um balão de destilação. Adicionou-se a solução de hidróxido de cálcio até que a alcalinização seja observada por contato com papel indicador. Adicionou-se alguns pedaços de pedra-pomes. Foi aquecido até o ponto de ebulição e recolheu-se aproximadamente 50 mL de destilado.

## 3.3 DETERMINAÇÃO DE METANOL, ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILO

De acordo com a OENO 70-2000, o método descrito permite determinar, ao mesmo tempo, vários componentes voláteis principais dos vinagres. O interesse dessa determinação é duplo, organolético e possivelmente toxicológico.

### 3.3.1 Reagentes e equipamentos

Solução padrão interno (4-metilpentan-2-ol); Solução de hidróxido de sódio a 40% (m/v); Cromatógrafo de fase gasosa (*Hewlett Packard*), Injector: *HP 6890 Series GC System*, Detector: FID, coluna *Megabore* 30 m,  $\phi$  0,53 mm, filme 1,0  $\mu$ m *Agilent*. Usou-se hélio como gás de araste (4 mL/min). Temperatura Injector: 210 °C, Temperatura Detector: 210 °C. Razão de *split*: 1/10. Volume de injeção: 1  $\mu$ L.

**Tabela 3.1** - Programa do forno utilizado na cromatografia gasosa.

Rampa Temperatura (°C/min)	Temperatura Final (°C)	Tempo Permanência (min)	Tempo Final (min)
Inicial	45	5,00	5,00
8,50	120	0,00	13,82
30,00	200	10,00	26,49

### 3.3.2 Técnica

Em 20 mL de amostra do vinagre, neutralizou-se a amostra a pH  $\pm$  7,00 com a solução de hidróxido de sódio e registrou-se o volume gasto de hidróxido de sódio. Retirou-se 10 mL da amostra neutralizada e adicionou-se 1 mL do padrão interno. Injetou-se 1  $\mu$ L da solução no cromatógrafo.

#### 3.3.2.1 Cálculo

- $c_i$  o conteúdo do componente 1, em mg/L, na solução de referência
- $c_e$  o conteúdo interno da solução padrão, em mg/L, na solução de referência

- $s_i$  a superfície do pico do componente 1 da solução de referência
- $s_e$  a superfície do pico da solução padrão interna na solução de referência
- $S_i$  a superfície do pico do componente 1 na solução de amostra neutralizada mais a solução padrão interna
- $S_e$  a superfície do pico da solução padrão interna na solução de amostra neutralizada mais a solução padrão interna
- $C_e$  o conteúdo interno da solução padrão, em mg/L, na solução de amostra neutralizada mais a solução padrão interna
- $f$  o fator de diluição resultante da neutralização da amostra de vinagre

O componente  $i$  conteúdo  $C_i$ , expresso em miligramas por L de vinagre, é dado por:

$$C_i = \frac{c_i s_e S_i C_e}{c_e s_i S_e} f$$

Limites de detecção para o Etanal, 2-Butanol, n-Propanol, Isobutanol, álcoois Amílicos e n-Butanol de 1,0 ng/L, para o Acetato de Etilo de 2,0 ng/L e para o Metanol de 3,0 ng/L. O Limite Quantificação para a Acetoína de 11,2 ng/L.

Ao equipamento de cromatografia está associado um sistema de tratamento de dados, que fornece diretamente os resultados encontrados para cada ensaio.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE ENXOFRE TOTAL

De acordo com a OENO 60/2000, na indústria dos vinagres de vinho, a adição de dióxido de enxofre ou sais (E 220 - E 227) é autorizado de acordo com padrões e doses definidos. Por conseguinte, as doses aplicadas devem ser verificadas, acima de tudo, o seu conteúdo de  $SO_2$ . O dióxido de enxofre total é a soma do dióxido de enxofre livre e do dióxido de enxofre combinado. Dióxido de enxofre livre é aquele encontrado nas formas  $H_2SO_3$ ,  $HSO_3^-$  e  $SO_3^{2-}$ . O dióxido de enxofre combinado é aquele encontrado em todas as outras formas.

#### 3.4.1 Reagentes e equipamentos

Ácido sulfúrico ( $p_{20} = 1,84$  g/mL); Solução de hidróxido de sódio 4 M; Solução de iodo a 0,025 M; Tetracetato de etileno diamina disódico ( $EDTA.Na_2$ ); Solução de amido a 5 g/L; Solução etanal a 7 g/L; Material e equipamento corrente de laboratório.

### 3.4.2 Técnica

#### 3.4.2.1 *Dióxido de enxofre livre*

Num balão cônico de 500 mL, adicionou-se 50 mL de vinagre, 3 mL de solução de ácido sulfúrico, 5 mL de solução de amido e 30 mg de EDTA.Na<sub>2</sub>. Titulou-se imediatamente com a solução de iodo até a coloração azul (persistente por 10 a 15 segundos).

#### 3.4.2.2 *Dióxido de enxofre combinado*

Ao balão cônico mencionado anteriormente, adicionou-se a solução de hidróxido de sódio até pH 11-12 (aproximadamente 18 mL), agitou-se e deixou-se em repouso por 5 min. Adicionou-se 17 mL de solução de ácido sulfúrico. Titulou-se imediatamente com a solução de iodo. Em seguida, adicionou-se 20 mL de solução de hidróxido de sódio, agitou-se e deixou-se em repouso por 5 min. Diluiu-se com 200 mL de água, o mais frio possível, agitou-se e adicionou-se 30 mL de solução de ácido sulfúrico. Titulou-se imediatamente o dióxido de enxofre liberado usando a solução de iodo.

#### 3.4.2.3 *Interferência de outras substâncias*

Existem outras substâncias que podem ser oxidadas pelo iodo em ambiente ácido; portanto, é necessário determinar a quantidade de iodo utilizada por essa oxidação.

Para isso, é necessário combinar o dióxido de enxofre livre por excesso de etanal ou propanal antes da titulação iodométrica. Para isso, adicionou-se 50 mL de vinagre a um balão Erlenmeyer de 300 mL e adicionou-se 5 mL de solução etanal. Deixou-se repousar por pelo menos 30 min. Adicionou-se 3 mL de solução de ácido sulfúrico, 5 mL de solução de amido e a solução de iodo até obter uma cor azul.

#### 3.4.2.4 *Cálculo*

Considerando:

- **V** o volume em mL da solução de iodo utilizada em Dióxido de enxofre livre.
- **V1** o volume em mL da solução de iodo utilizada para a primeira titulação de Dióxido de enxofre combinado
- **V2** o volume em mL da solução de iodo utilizada para a segunda titulação de Dióxido de enxofre combinado
- **V3** o volume em mL da solução de iodo utilizada em Interferência de outras substâncias.

O teor total de dióxido de enxofre expresso em miligramas de SO<sub>2</sub> por litro de vinagre é:

$$32 \times (V + V1 + V2 - V3).$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Algumas análises feitas por rotina não são suficientes para avaliar a autenticidade do vinagre, nem para distinguir a sua origem. Há portanto, necessidade de utilizar técnicas mais complexas, como as de análises isotópicas.

Em 1992, Remaud *et al.* foram os primeiros a usar o SNIF-RMN para avaliar a adulteração de vinagre. O método foi baseado na razão dos isótopos de deutério e hidrogênio (D/H) na posição específica (grupo metilo) do ácido acético. O ácido acético, obtido por fermentação e por um dos diferentes mecanismos biossintéticos apresenta proporções isotópicas diferentes.

### 4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE ISOTÓPICA (D/H) POR SNIF-RMN

Após a análise dos estudos publicados e apresentados na fundamentação teórica, tornou-se evidente a importância dos procedimentos preliminares de preparação das amostras de vinagre a serem analisadas por SNIF-RMN para avaliação da autenticidade. Os melhores resultados encontrados nos vários estudos apontavam para extração do ácido acético com acetato de etilo ou com éter dietílico.

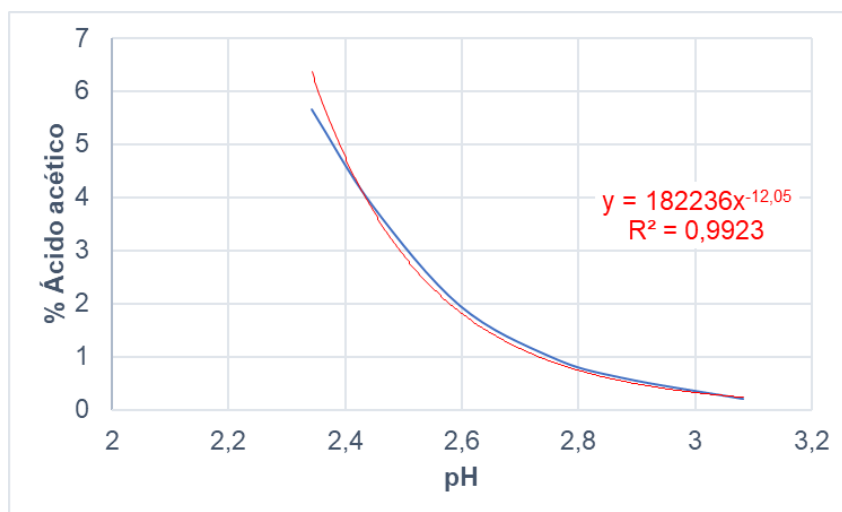
A partir deste conhecimento, desenvolveu-se um procedimento experimental de preparação da amostra para determinação da razão deutério/hidrogênio por SNIF-RMN.

Foi escolhido o acetato de etilo como solvente na extração, devido à sua melhor performance e por ser menos perigoso que o éter etílico no seu manuseamento e riscos para a saúde e ambiente.

Com a finalidade de otimizar o processo, foram testadas algumas combinações quanto à relação amostra/solvente, número de extrações e tempo por extração.

No procedimento utilizou-se para a extração uma ampola de extração e para a purificação a coluna de *Cadiot*. Outros métodos utilizando um extrator *Soxhlet* e evaporador rotativo foram também ensaiados, mas mostraram não ser adequados para a preparação da amostra de vinagre por deixarem uma quantidade considerável de resíduo, tanto de água, como de solvente na amostra, afetando assim a concentração final de ácido acético e consequentemente o processo de purificação.

Foi observada a relação entre a quantidade de ácido acético na amostra e o respetivo valor de pH e criado um modelo para traduzir esta relação (Figura 4.1).



**Figura 4.1** - Relação entre concentração de ácido acético e pH da amostra.

A Figura 4.1 apresenta uma equação obtida a partir de amostras de ácido acético com concentrações conhecidas (eixo y) e os pH respectivos (eixo x). Desta forma foi possível, a cada extração realizada, saber a quantidade de ácido acético ainda presente e calcular a taxa de extração de ácido acético.

Foram testadas algumas combinações até encontrar a melhor resposta, quanto á quantidade extraída de ácido acético, considerando também o tempo total da extração, a quantidade de solvente e amostra gastos. Sendo (A) o número de extrações, (B) o tempo por cada extração e (C) a relação amostra/solvente.

Numa das combinações testadas (Tabela 4.1), para uma amostra de 50 mL de vinagre, obteve-se no fim das extrações:

94% de ácido acético extraído, 35 minutos de duração e 175 mL de solvente utilizado.

**Tabela 4.1** - Extração com (A) =7, (B) =5 e (C) =2/1.

Extração	pH	% ácido acético extraído
1	2,505	58
2	2,572	70
3	2,645	78
4	2,707	84
5	2,789	89
6	2,877	92
7	2,923	94

Já noutra combinação testada (Tabela 4.2), para uma amostra de 50 mL de vinagre, obteve-se no fim das extrações:

- 93% de ácido acético extraídos, 60 minutos de duração e 200 mL de solvente utilizado.

**Tabela 4.2** - Extração com (A) =4, (B) =15 e (C) =1/1.

Extração	pH	% ácido acético extraído
1	2,613	67
2	2,722	80
3	2,865	89
4	2,962	93

Ao comparar os resultados da Tabela 4.1 e 4.2 pode-se perceber que a combinação do segundo ensaio levou a um maior gasto de solvente e quase o dobro do tempo para que no final obtivessem praticamente a mesma % de ácido acético extraído. Após diversos ensaios com diferentes combinações pode-se elaborar um procedimento para a preparação de amostra do vinagre para análise em SNIF-RMN (Anexo I).

Os resultados obtidos foram melhores que os reportados por Ko *et al.* em 2013, como exemplo da combinação da Tabela 4.1 obteve-se 94% de taxa de extração, enquanto Ko *et al.* (2013) obteve 85%, a diferença veio do fator C, observando assim que uma maior razão entre amostra e solvente, obtem-se uma maior taxa de extração do ácido acético.

#### 4.2 ACIDEZ TOTAL DO VINAGRE

Foram analisadas 163 amostras de vinagres (Anexo II), divididas em duas categorias, sendo 65 amostras de vinagres classificadas como de outra origem, que inclui vinagre de sidra, arroz, coco, laranja, romã, figo, álcool, tomate, cereal, frutos vermelhos, de fruta, mel, manga, maracujá e 98 amostras classificadas como vinagre de vinho. O vinagre de vinho é obtido exclusivamente a partir de vinho, e pode apresentar-se como vinagre tinto, branco, de Modena, Rosé, do Porto, da Madeira entre outros.

Avaliou-se a conformidade das amostras de vinagre quanto ao limite mínimo legal da acidez total (Tabela 4.3).

O teor de acidez total é apresentado em gramas de ácido acético por litro. A determinação é feita por titrimetria de acordo com a OENO 54/2000.

Para o vinagre de outra origem, a concentração mínima é de 50 g/L em ácido acético e para o de vinho 60 g/L em ácido acético, de acordo com a legislação vigente.



**Tabela 4.3** - Análise da conformidade da acidez total nas amostras de vinagre.

<b>Vinagre</b>	<b>Média (g/L)</b>	<b>Mediana</b>	<b>Conforme</b>	<b>Não conforme</b>
Outra origem	54,1 ± 16,5	51,3	49	16
Vinho	65,2 ± 10,6	61,6	83	15
<b>Total</b>	-	-	132 (81,0%)	31 (19,0%)

Para a acidez total, as amostras estão dentro do limite legal na sua maioria (81,0%), enquanto 31 amostras (19,0%) estavam abaixo do limite permitido pela legislação. Foi observado um facto inesperado em 4 casos de vinagre de outra origem (álcool, arroz, cereal e coco), em que na própria embalagem declarava uma acidez de 4%, o que pode indiciar falta de informação por falta de alguns produtores quanto a legislação. Deve-se ter em conta que os produtos existentes no mercado português devem estar de acordo com a legislação europeia, mesmo que oriundos de países terceiros, salvo produtos incluídos em acordos bilaterais.

#### 4.3 ÁLCOOL RESIDUAL

Foram analisadas 146 amostras de vinagres (Anexo II), quanto ao teor de álcool residual, divididas em duas categorias, sendo 57 amostras de vinagres classificadas como de outra origem e 89 amostras classificadas como vinagre de vinho.

Avaliou-se a conformidade das amostras de vinagre quanto ao limite máximo legal do respetivo teor de álcool residual (Tabela 4.4).

O vinagre deverá ter uma concentração máxima de 0,5% (v/v) para vinagres de outras origens. Já para o vinagre de vinho deverá ter uma concentração máxima de álcool residual de 1,5% (v/v).

**Tabela 4.4** - Análise da conformidade do álcool residual nas amostras de vinagre.

<b>Vinagre</b>	<b>Álcool residual Média (%v/v)</b>	<b>Mediana</b>	<b>Conforme</b>	<b>Não conforme</b>
Outra origem	0,33	0,20	55	2
Vinho	0,42	0,13	82	7
<b>Total</b>	-	-	137 (93,8%)	9 (6,2%)

Quanto ao teor do álcool residual, 137 amostras estão dentro do limite legal (93,8%). Enquanto 9 amostras (6,2%) estavam acima do limite permitido pela legislação, sendo a maior ocorrência em vinagres de vinho.

#### 4.4 DIÓXIDO DE ENXOFRE TOTAL

A utilização de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) é uma prática autorizada, em tratamentos enológicos. Na União Europeia, os sulfitos são representados pelo código E220-E228, excluindo o E225, e considerados, a partir de 2005, como alergénicos (Deco, 2011).

Foram analisadas 134 amostras de vinagres (Anexo II), quanto ao teor do dióxido de enxofre total, divididas em duas categorias, sendo 48 amostras de vinagres classificados como de outra origem e 86 amostras classificadas como de vinagre de vinho.

Avaliou-se a conformidade das amostras de vinagre quanto ao limite máximo legal do dióxido de enxofre total (Tabela 4.5). Nos vinagres, os teores máximos encontram-se expressos em SO<sub>2</sub> e referem-se às quantidades totais, de todas as origens. A concentração máxima permitida é de 170 mg SO<sub>2</sub>/L para os vinagres de acordo com o Regulamento (UE) N.º 1129/2011 e suas alterações. Há, porém, vinagres que têm legislação específica, nomeadamente os vinagres DOP.

**Tabela 4.5** - Análise da conformidade do dióxido de enxofre total nas amostras de vinagre.

<b>Vinagre</b>	<b>Média (mg/L)</b>	<b>Mediana</b>	<b>Conforme</b>	<b>Não conforme</b>
Outra origem	101,0 ± 59,8	93,0	44	4
Vinho	103,8 ± 74,8	93,0	75	11
<b>Total</b>	-	-	119 (88,8%)	15 (11,2%)

Relativamente ao teor de dióxido de enxofre total 88,8% das amostras estão dentro do respectivo limite legal. Enquanto 15 amostras (11,2%) estavam acima do limite permitido pela legislação.

O SO<sub>2</sub> tem o papel de proteger o vinho da ação de bactérias e impedir a ação de enzimas oxidativas. Também atua na proteção enzimática, pois reage fortemente com o oxigénio devido à alta afinidade por este substrato. Impedindo a reação do oxigénio com os compostos orgânicos do vinho, inibindo os processos de oxidação, garantindo a sua qualidade e longevidade (Pereira, 2014). No vinagre o SO<sub>2</sub> tem a função de conservante.

Quando ingerido em doses elevadas, os sulfitos podem ser tóxicos. A ingestão de quantidades acima de 0,7 miligramas por quilo diários pode provocar, entre outros, dores de cabeça e abdominais, náuseas, vômitos e diarreia, bem como reações asmáticas graves e, em casos extremos, a morte. É fundamental que os limites legais não sejam ultrapassados e se faça referência à presença destas substâncias nos produtos embalados e a granel, para que pessoas sensíveis consigam evitar a sua ingestão em doses exageradas (Deco, 2011).

Teoricamente, a quantidade de vinagre que cada pessoa ingere é muito inferior ao valor limite a partir do qual se pode observar perturbações digestivas ou outros problemas de saúde. Como o SO<sub>2</sub> é um composto muito instável em meio ácido, como é o caso do vinagre, o SO<sub>2</sub> irá perder-se facilmente.

#### 4.5 METANOL, ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILO

Pela técnica de cromatografia gasosa, pode-se determinar alguns componentes voláteis das amostras de vinagres. Os compostos avaliados foram: Etanal, Acetato de Etilo, Metanol, 2 Butanol, n Propanol, Isobutanol, n-Butanol, álcoois Amílicos e acetoína.

A Figura 4.2, mostra um cromatograma de uma amostra de vinagre de sidra.

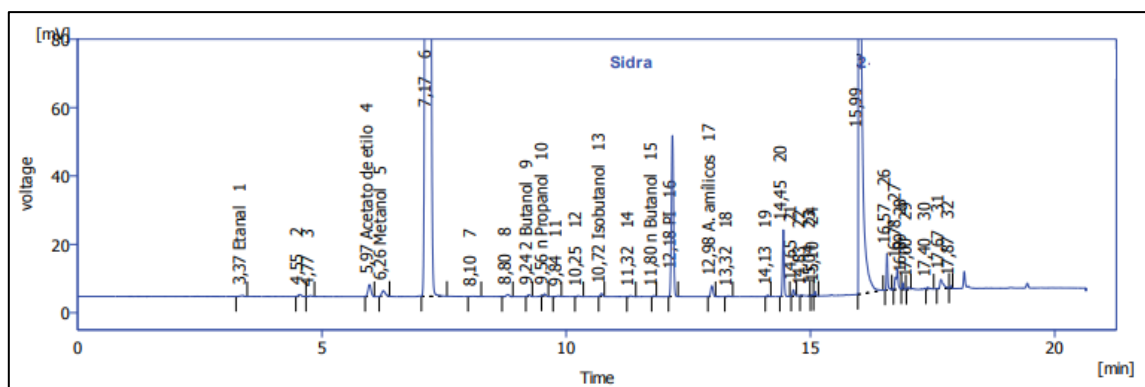


Figura 4.2 - Cromatograma de uma amostra de vinagre de sidra.

O aroma da sidra é constituído por alcoóis superiores, tais como os amílicos, 2-fenil-etanol, n-butanol, 2-3 butanodiol, e ésteres como o acetato de etilo. Alguns desses compostos são próprios da maçã como o butanol, enquanto outros como os alcoóis amílicos e o acetato de etilo são produtos da fermentação (Picinelli *et al.*, 2000).

Os principais compostos voláteis encontrados na sidra, conforme Simões *et al.*, (2009), são: 1-butanol, 1-propanol, 1-Hexanol, Etil Acetato, Etil hexanoato, Metanol, Etil lactato, Álcool isoamílico, Álcool amílico, 2-metil butil acetato, Butil acetato, Butil butanoato, Etil 2-metil butanoato, Etil butanoato, Hexanal, Hexil acetato, Hexil butanoato, Hexil-2-metil-butanoato, Pentil acetato.

A Figura 4.3, mostra um cromatograma do vinagre de vinho tinto.

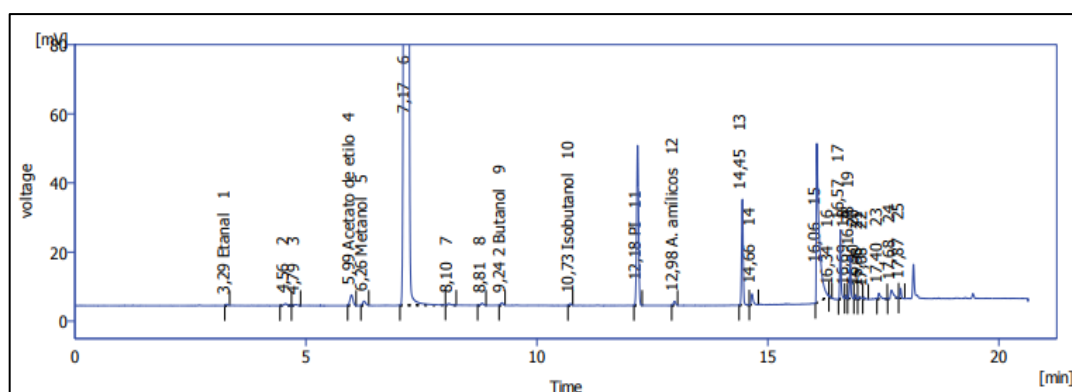
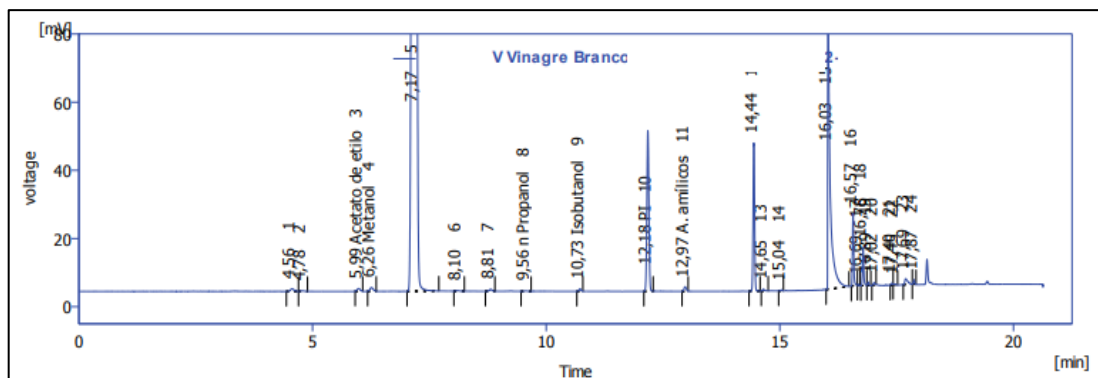


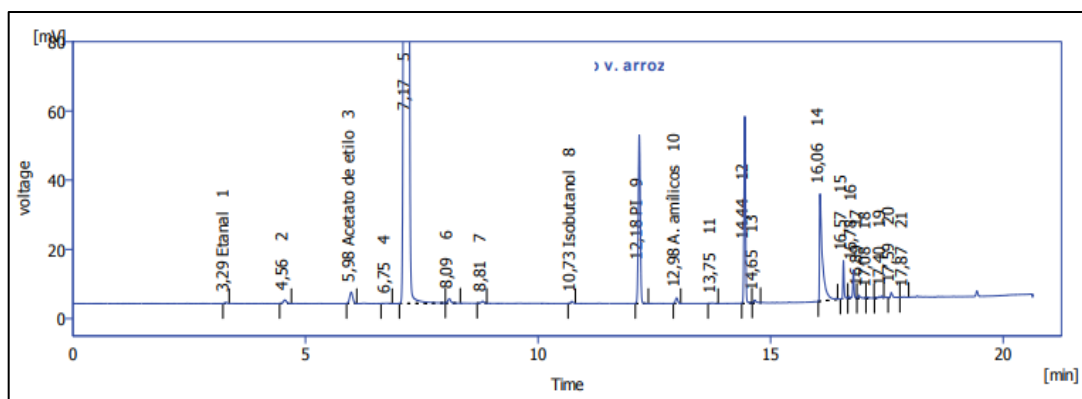
Figura 4.3 - Cromatograma de uma amostra de vinagre de vinho tinto.

A Figura 4.4, mostra um cromatograma relativamente ao vinagre de vinho branco.



**Figura 4.4** - Cromatograma de uma amostra de vinagre de vinho branco.

A Figura 4.5, mostra um cromatograma de vinagre de arroz.



**Figura 4.5** - Cromatograma de uma amostra de vinagre de arroz.

O metanol é um álcool encontrado normalmente em pequena quantidade no vinho e no vinagre. No vinagre, o metanol provém do vinho utilizado para acetificação e como não é oxidado pelas bactérias acéticas, a quantidade inicialmente presente no vinho encontra-se no vinagre. O teor de metanol no vinagre de vinho branco italiano varia entre 20 mg/L a 30 mg/L, enquanto no vinagre de vinho tinto varia de 30 mg/L a 90 mg/L (Rizzon & Miele, 2003).

Os pesquisadores Rizzon & Miele em 2003 realizaram um estudo por cromatografia gasosa, a fim de caracterizar o vinagre de vinho, através da determinação de acetoína e metanol. Observou-se que 66,6% dos vinagres de vinho branco apresentaram menos de 25 mg/L de metanol e 53,6% dos vinagres de vinho tinto menos de 50 mg/L.

Relativamente ao teor de acetoína, os vinagres elaborados com álcool apresentaram apenas traços de acetoína na sua composição, proveniente do substrato fornecido para o desenvolvimento das bactérias acéticas no início do processo de acetificação. O vinagre de maçã, por sua vez, apresentou um teor de acetoína comparável ao do vinagre de vinho. Nesse sentido, o teor de acetoína permite diferenciar o vinagre de álcool do vinagre de vinho, mas não exerce efeito discriminante para separar o vinagre de vinho do vinagre de maçã (Rizzon & Miele, 2003).

O vinagre elaborado a partir do álcool de cana-de-açúcar contém uma concentração reduzida de metanol. O vinagre de maçã, por sua vez, apresenta um teor de metanol comparável ao do vinho. Assim é possível diferenciar o vinagre de álcool dos vinagres de vinho e de maçã.

Nas amostras de vinagres analisados (Anexo III), para o vinagre de sidra os teores apresentaram em média 44,3 mg/L de metanol, 108,5 mg/L de acetato de etilo, 36,4 mg/L para os álcoois superiores e 563,0 mg/L de acetoína, o Etanal teve uma variação entre 3,19 a 60,45 mg/L. Em vinagres de sidra do tipo não filtrado, os teores observados foram em média 269,8 mg/L de metanol, 64,8 mg/L de acetato de etilo, 8,16 mg/L de Etanal, 75,7 mg/L para os álcoois superiores e 1351,5 mg/L de acetoína. A concentração mínima para a acetoína foi de 335,9 mg/L e máxima de 1450,2 mg/L. Destaque para a presença de Isobutanol e Alcoóis amílicos presentes em todas as amostras com variações entre 3,7 a 20,9 mg/L e 6,4 a 44,4 mg/L respectivamente. Importa salientar a presença do n-Butanol encontrado neste tipo de vinagre com variação entre 2,7 e 15,6 mg/L e não presente em vinagres de vinho, sendo assim, um do composto que pode ser usado para a diferenciação da origem.

Para as amostras de vinagre de vinho branco os teores têm em média 36,9 mg/L de metanol, 90,8 mg/L de acetato de etilo, 11,0 mg/L de Etanal, 25,6 mg/L para os álcoois superiores e 551,9 mg/L de acetoína.

Nos vinagres de vinho tinto os teores observados foram em média de 58,1 mg/L de metanol, 64,5 mg/L de acetato de etilo, 17,8 mg/L de Etanal, 32,2 mg/L para os álcoois superiores e 531,9 mg/L de acetoína. Enquanto o Isobutanol e Alcoóis amílicos apresentaram variações entre 6,2 a 8,8 mg/L e 13,7 a 19,3 mg/L respectivamente.

Em outros tipos de vinagres, como o de arroz, o destaque é para o metanol que variou entre 0,0 e 4,4 mg/L, para o acetato de etilo que apresentou um valor médio de 173,2 mg/L, para os álcoois superiores com valor médio de 22,6 mg/L, para o Etanal com valor médio de 13,0 mg/L e para a acetoína em que se obteve um valor médio de 1190,7 mg/L. No vinagre de figo destaque para os valores médios de 89,8 mg/L para o metanol, 5,7 mg/L de Etanal e 1730 mg/L para a acetoína.

Comparando os diferentes vinagres e os diferentes compostos analisados, a acetoína não foi útil para a diferenciação da origem dos vinagres, o metanol pode ser utilizado para diferenciar vinagres de origem vínica, tendo os vinagres de vinho tinto um teor acima de 50 mg/L de metanol. Dentro dos álcoois superiores, o n-Butanol pode ajudar na diferenciação entre vinagres de sidra e de origem vínica.

## 5. CONCLUSÕES

Para efetuar a avaliação da autenticidade de vinagres, verificou-se a necessidade de proceder a extração prévia do ácido acético da amostra, antes da sua análise por SNIF-RMN, devido ao alto teor de água presente no vinagre. No método de extração estudado neste trabalho foram testadas diferentes combinações de volume de solvente por volume de amostra e tempo de extração, tendo-se apresentado como melhor a que inclui acetado de etilo, a razão de 2:1 entre amostra/solvente e 5 minutos para o tempo de cada extração. A partir dos resultados obtidos criou-se um procedimento para a preparação das amostras de vinagre.

Nas análises físico-químicas, efetuadas no âmbito deste trabalho, em amostras de vinagre a maior parte apresentaram resultados dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Para a acidez total, 81,0% das amostras estão em cumprimento com o respetivo limite legal. Em relação ao teor total do dióxido de enxofre total, 88,8% das amostras encontram-se dentro do limite legal.

Quando comparados, os compostos voláteis determinados neste trabalho, entre as amostras de vinagres de diferentes origens de matérias-primas, indiciam que alguns poderão ser usados como forma de discriminação entre os vários tipos de vinagre. No caso do metanol, houve uma diferença relevante que pode indiciar diferenciação num tipo de vinagre. No entanto considera-se que este estudo deve ser continuado, para uma amostragem e origem de vinagres alargadas, de modo a sustentar esta possível diferenciação.

Ao comparar os resultados obtidos para os restantes compostos voláteis analisados, também considera-se que o Acetato de etilo, o n-Propanol, o Isobutanol, o n-Butanol e os álcoois amílicos podem vir a ser usados como compostos para complementar a diferenciação da origem da matéria-prima nos vinagres. Contudo, no caso do Etanal não houve uma diferença relevante entre os resultados que indicasse uma tendência no sentido da diferenciação entre matérias-primas.

Os teores de acetoína determinados, apresentaram-se com capacidade para diferenciar o vinagre de álcool do vinagre de vinho, mas não apresentaram efeito discriminante para separar o vinagre de vinho do vinagre de sidra.

A cromatografia gasosa mostrou-se adequada para a diferenciação de compostos voláteis de vinagres de diferentes origens.

Torna-se necessário prosseguir e desenvolver mais estudos no sentido de construir um registo de caracterização dos vinagres Portugueses de várias origens, de modo a facilitar a sua apreciação como produto de interesse alimentar e económico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U. A. (2001) *Biotecnologia Industrial*. Vol. IV. São Paulo: Blucher, pgs 183–208.
- ASAE. (2016) Plano Operacional. Disponível em: <<https://www.asae.gov.pt/inspecao-fiscalizacao/fraude-alimentar/plano-operacional.aspx>>. Acedido em 23/02/2020.
- ASAE. (2018) Área Alimentar. Disponível em: <<https://www.asae.gov.pt/inspecao-fiscalizacao/plano-de-inspecao-da-asae-pif/area-alimentar.aspx>>. Acedido em 23/02/2020.
- ASAE. (2020a) Missão, Visão e Valores. Disponível em: <<https://www.asae.gov.pt/asae20/missao-visao-e-valores.aspx>>. Acedido em 23/02/2020.
- ASAE. (2020b) Lab. Bebidas e Produtos Vitivinícolas. Disponível em: <<https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/laboratorio-de-seguranca-alimentar/lab-bebidas-e-produtos-vitivincolas.aspx>>. Acedido em 23/02/2020.
- Ashurst, P. R. & Dennis, M.J. (1998) "Analytical methods of food authentication". *Blackie Academic & Professional*, Londres, 350 pgs.
- Azambuja, W. (2017) Cromatografia. Disponível em: <<https://bit.ly/2VUGHgb>>. Acedido em 07/03/2020.
- Bellagi, A.; Binous, H.; Al-Harhi, M. (2015) "Separation of Acetic Acid from Water Using Ethyl Acetate Entrainer". *Wolfram Demonstrations Project*.
- BEVTEC. (2020) "Frings". Disponível em: <<http://www.bevtec.es/pt-pt/frings/>>. Acedido em 07/03/2020.
- Boffo, E. F. (2004) Estudo de origem biossintética do ácido acético e determinação da acidez em amostras de vinagres comerciais via RMN de  $^2\text{H}$  e  $^1\text{H}$ . Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Boffo, E. F. (2009) Utilização da RMN aliada a métodos quimiométricos na análise de méis e aguardentes. Dissertação (Doutorado em Ciências/Química Orgânica), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- BRASIL. (1986) Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, pt. 2.
- Budak, N. H.; Aykin, E.; Seydim, A. C.; Greene, A. K.; Guzel-Seydim, Z. B. G. (2014) "Functional Properties of Vinegar". *Journal of Food Science*. Vol. 79, nº 5, pgs 757–764.
- Callejón, R. M.; Reina, R. R.; Morales, M. L.; Troncoso A. M.; Thomas, F.; Camin, F. (2015) "Vinegar". In: *FI Handbook on Food Authenticity Issues and Related Analytical Techniques*. Morin, J. F. and Lees, M. (Eds), Fera Science Limited, pgs 273–294.
- Carlroth. (2020) Hidróxido de sódio. Ficha de Dados de Segurança.
- Carvalho, W.; Silva, D. D. V.; Canilha, L.; Mancilha, I. M. (2005) Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte I: ácidos orgânicos. *Revista Analytica*, nº 18, pgs 70–76.
- Consonni, R.; Cagliani, L. R.; Benevelli F.; Spraul M.; Humpfer, E.; Stocchero, M. (2008) "NMR and Chemometric methods: A powerful combination for characterization of Balsamic and Traditional Balsamic Vinegar of Modena". *Analytica Chimica Acta*, Vol. 611, pgs 31–40.



- Deco. (2011) Sulfitos. Disponível em: <<http://bit.ly/39RUyIk>>. Acedido em 14/03/2020.
- Decreto-Lei n.º 174/2007. (2007) Diário da República n.º 88/2007, Série I de 2007-05-08. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- ECHA. (2020) Pictogramas CRE. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/pt/regulations/clp/clp-pictograms>>. Acedido em 02/05/2020.
- Embrapa. (2006) Sistema de Produção de Vinagre. ISSN 1678–8761.
- Ferreira, A. I. A. J. V. (2008) Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas. Tese (Doutorado em Química), Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Gopal, J.; Anthonydhason, W.; Muthua, M.; Gansukh, E.; Jung, S.; Chul, S.; Iyyakkannu, S. (2019) “Authenticating apple cider vinegar’s home remedy claims: antibacterial, antifungal, antiviral properties and cytotoxicity aspect”. *Natural Product research*. Vol. 33, nº 6, pgs 906-910.
- Grégrová, A.; Čížková, H.; Mazáč, J.; Voldřich, M. (2012) “Authenticity and quality of spirit vinegar: Methods for detection of synthetic acetic acid addition”. *Journal of Food and Nutrition Research*. Vol. 51, nº 3, pgs 123–131.
- Hermann, A. (2001) “Determination of D/H isotope ratio in acetic acid from vinegars and pickled products by H-NMR-spectroscopy”. *European Food Research and Technology*. Vol. 212, pgs 683–686.
- Hsieh, C. W.; Li, P. H.; Cheng, J. Y.; Ma, J. T. (2013) “Using SNIF-NMR method to identify the adulteration of molasses spirit vinegar by synthetic acetic acid in rice vinegar”. *Industrial Crops and Products*, Vol. 50, pgs 904–908.
- IMARC. (2020) “Vinegar Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2020-2025.” Disponível em: <<https://www.imarcgroup.com/vinegar-manufacturing-plant>>. Acedido em 08/02/2020.
- IMBEL. (2009) Éter Etílico. Ficha de Informações de Segurança De Produto Químico (FISPQ).
- Khan Academy. (2020) Plantas C3, C4 e CAM. Disponível em: <<http://bit.ly/3cFd0pi>>. Acedido em 07/03/2020.
- Ko, W. C.; Cheng, J. Y.; Chen, P. Y.; Hsieh, C. W. (2013) “Optimized Extraction Method of Acetic Acid in Vinegar and Its Effect on SNIF-NMR Analysis to Control the Authenticity of Vinegar”. *Food Bioprocess Technol*, Vol. 6, nº 8, pgs 2202-2206.
- Marques, F. P. P. (2008) Características físico-químicas, nutricionais e sensoriais de vinagres de diferentes matérias-primas. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Goiás, Goiás.
- Marques, A. R. S. (2019) Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar), Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Meneguzzo, J.; Rizzon, L. A. (2006) Sistema de produção de vinagre. Sistemas de Produção (Embrapa Uva e Vinho), nº 13, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul.
- Merck. (2019) Acetato de etilo. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ).
- Moreno, E. L.; Martins, E. & Rajagopal, K. (2015) Basicidade e Acidez, da Pré-História aos Dias Atuais. *Rev. Virtual Quim.*, Vol. 7, nº 3, pgs. 893-902.

Nagy, K. & Vékey, K. (2008) "Separation methods". In: Medical Applications of Mass Spectrometry, Vékey, K., Telekes, A., Vertes, A. (eds), pgs. 61–89, Elsevier Science, Boston, USA.

NFPA. (2020) "Standard System for the Identification of the Hazards of Materials for Emergency Response". Disponível em: <[www.nfpa.org](http://www.nfpa.org)>. Acedido em 19/01/2020.

OENO 52-2000. (2000) "Wine Vinegars - Determination of Total Acidity Content". Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV).

OENO 56-2000. (2000) "Wine Vinegars - Determination of the Residual Alcohol Content". Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV).

OENO 60-2000. (2000) "Wine Vinegars - Determination of the total Sulfur Dioxide Content". Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV).

OENO 69-2000. (2000) "Wine Vinegar - Measurement of the Acetoin content". Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV).

OENO 70-2000. (2000) "Wine Vinegars - Measurement of Methanol, Superior Alcohols and Ethyl Acetate". Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV).

OENO 71-2000. (2000) "Wine Vinegar - Authentification Via Fine-NMR and other Isotopic Methods". Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV).

OENO 510-2013. (2013) "Method for  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratio determination of acetic acid in wine vinegar by isotopic mass spectrometry". Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV).

OIV. (2000) "Compendium of methods of analysis of wine vinegars". Disponível em: <<http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-methods-of-analysis-of-wine-vinegars>>. Acedido em 24/02/2020.

Pereira, A. F. (2014) Otimização da produção de vinagre de mel. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar), IPB, Bragança.

PLVPQ. (2020) Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos - Cromatografia. Disponível em: <<http://bit.ly/2TIU0O4>>. Acedido em 01/03/2020.

Proortal. (2018) "Fabricación de vinagres". Disponível em: <<https://www.proortal.com/proortal-food/fabricacion-de-vinagres/>>. Acedido em 07/03/2020.

Reece, J. B.; Urry, L. A.; Cain, M. L.; Wasserman, S. A.; Minorsky, P. V.; Jackson, R. B. (2011). "Alternative mechanisms of carbon fixation have evolved in hot, arid climates". *Campbell biology*, 10 ed., San Francisco, Califórnia.

Regulamento (CE) N.º 1333/2008. (2008) "Regulation (EC) N.º 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. Official Journal of the European Union". L 354/16–33.

Regulamento (UE) N.º 1129/2011. (2011) REGULAMENTO (UE) N.º 1129/2011 DA COMISSÃO de 11 de Novembro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. L 295/1.

Regulamento (UE) 2016/263. (2016) "Commission Regulation (EU) 2016/263 of 25 February 2016 amending Annex II to Regulation (EC) N.º 1333/2008 of the European Parliament and of the Council as regards the title of the food category 12.3 Vinegars". *Official Journal of the European Union*. L 50/25.

Remaud, G.; Guillou, C.; Vallet, C.; Martin, G. J. (1992) "A coupled NMR and MS isotopic method for the authentication of natural vinegars". *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 342, pgs 457–461.

Rizzon, L. A.; Meneguzzo, J. (2002) Elaboração de vinagre. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves. ISSN 1516-8107.

Rizzon, L. A.; Miele, A. (2003) Determinação de acetoína e metanol em vinagres de vinho brasileiros. *B. CEPPA*. Vol. 21, nº I, pgs 159-168.

Sadava, D.; Hillis, D.; Heller, C.; Hacker, S. (2019) Vida: A Ciência da Biologia - Constituintes Químicos da Vida, Células e Genética. *Artmed*. Vol. I, 11 ed., Porto Alegre.

Saha, B.; Chopade, S. P.; Mahajani, S. M. (2000) "Recovery of dilute acetic acid through esterification in a reactive distillation column". *Catalysis Today*, Vol. 60, pgs 147–157.

Santos, V. S. (2020) Plantas CAM. Disponível em: <<https://www.preparaenem.com/biologia/plantas-cam.htm>>. Acedido em 20/01/2020.

Simões, D. R. S.; Waszczynskyj, N.; Wosiacki, G. (2009) Aromas em maçãs, suco e sidra: revisão. *B. CEPPA*. Vol. 27, nº 1, pgs. 154–172.

Spinosa, W. A. (2002) Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Suman, P. A. (2012) Processo de obtenção de vinagre de gengibre. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

SuperQuímica. (2012) Ácido acético. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ).

Tanamool, V.; Chantarangsee, M.; SoemphoL, W. (2020) "Simultaneous vinegar fermentation from a pineapple by-product using the co-inoculation of yeast and thermotolerant acetic acid bacteria and their physiochemical properties". *3 Biotech*. Vol. 10, nº 115.

UNESP. (2020) Diagrama de Hommel. Disponível em: <[http://www6.fcav.unesp.br/intralab/substancias\\_id.php?recordID=46](http://www6.fcav.unesp.br/intralab/substancias_id.php?recordID=46)>. Acedido em 19/01/2020.

Vallet, C.; Arendt, M.; Martin, G. J. (1998) "Site specific isotope fractionation of hydrogen in the oxidation of ethanol into acetic acid. Application to vinegars". *Biotechnology Techniques*. Vol. 2, pgs 83–88.

Vieira, W. T. (2019) Caracterização cromatográfica e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato pirolenhoso obtido a partir de biomassas residuais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas.

Veloso, C. L. (2013) Sistema de produção de vinagre. Dossiê técnico, Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (SBRT).

Vignali, C.; Caligiani, A.; Palla, G. (2007) "Quantitative  $^2\text{H}$  NMR spectroscopy with  $^1\text{H}$  lock extender". *Journal of Magnetic Resonance*. Vol. 187, pgs 120–125.

Werner, R. A. & Roßmann, A. (2015) "Multi element (C, H, O) stable isotope analysis for the authentication of balsamic vinegars". *Isotopes in Environmental and Health Studies*. Vol. 51, pgs 58–67.

Xavier, L.; Remédios, M.; Maria, R.; Fontes, S.; Karine, S. (2009) Produção do vinagre de maçã. Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal. Disponível em: <<https://www.doccity.com/pt/producao-do-vinagre-de-maca-1/4710982/>>. Acedido em 20/01/2020.

Zanão, L. R. (2019) Desenvolvimento de método para previsão de parâmetros físico-químicos do óleo diesel comercial por cromatografia gasosa ultrarrápida – CG-UR e quimiometria. Dissertação (Doutorado em Química), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara.



## ANEXOS

### ANEXO I.


Procedimento experimental proposto de otimização das condições de preparação da amostra.

#### VINAGRE – PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA SNIF-RMN

### 1. INTRODUÇÃO

Antes das análises isotópicas por SNIF-RMN, é importante aumentar a concentração em ácido acético e consequentemente reduzir o teor de água em cada amostra. Sendo o processo de extração líquido-líquido, um modo de separar um componente ou componentes específicos de uma mistura heterogenea de líquidos, é o processo de separação proposto neste trabalho, para separar o ácido acético, em cada amostra de vinagre. É, portanto, necessário efetuar a extração do ácido acético da amostra de vinagre.

### 2. EQUIPAMENTOS E REAGENTES

- Material usual de laboratório e também:
- 100 mL amostra de vinagre
- Proveta 25 mL
- Acetato de etilo (IUPAC: *Ethyl acetate*) 
- Ampola de decantação com tampa
- Luvas impermeáveis (borracha butílica ou teflon®)
- Máscara com filtro para vapores orgânicos
- Óculos contra respingos (quando não for usado máscara panorâmica)
- Coluna *Cadiot* com tira rotativa

### 3. IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

#### 3.1 ACETATO DE ETILO

- **Principais perigos:** Vapores inflamáveis podem ser liberados
- **Efeitos agudos:** Quando inalados ou ingeridos os vapores causam irritação do trato respiratório. O contato com a pele pode causar leve irritação. Contato amplo, prolongado ou repetido pode resultar em dermatite. Os vapores causam irritação dos olhos. O contato com o líquido pode causar queimaduras
- **Prevenção de incêndio e explosão:** Elimine fontes quentes e de ignição. Todos os equipamentos elétricos usados devem ser blindados e a prova de explosão
- **Medidas de primeiros socorros:** Em contato com os olhos ou pele, lavar com água corrente. Remova lentes de contato, se tiver

- **Produtos e materiais incompatíveis:** Manter afastado de bases fortes e evitar contato com o ar.

#### 4. MÉTODO

- Preparar a aparelhagem de extração;
- Rotular um frasco de 250 mL com Fase Aquosa e outro frasco de 250 mL com Fase Orgânica e a codificação da amostra de vinagre;
- Colocar 50 mL da amostra de vinagre na ampola de decantação;
- Adicionar 25 mL de acetato de etilo e tapar a ampola;
- Com uma mão segurar a tampa junto ao corpo da ampola firmemente e com a outra a torneira;
- Inclinar e agitar lentamente;
- Agitar as soluções suavemente girando a mão que está segurando a tampa;
- Abrir a torneira para igualar a pressão da ampola á pressão externa;
- Repetir os passos vii e viii três vezes;
- Girar a ampola e colocar no suporte. Retirar a tampa e aguardar 5 minutos para as fases se separarem;
- Abrindo a torneira lentamente transferir a fase inferior para um frasco (Fase aquosa). Fechar a torneira antes da interface começar a passar por ela;
- Transferir, pela parte superior da ampola, a fase remanescente para um frasco (Fase Orgânica);
- Colocar a Fase Aquosa de volta a ampola e repetir as operações de iv a xii mais 3 vezes. Colocar sempre a fase superior no frasco Fase Orgânica;
- Após a amostra ter sido extraída 4 vezes, retirar a fase aquosa,
- Repetir o procedimento, com mais 50 mL da amostra do vinagre
- Para remoção do residuo de solvente, ainda presente na fase aquosa, proceder a destilação da mesma, com Coluna *Cadiot*.

#### Observações

- No total, serão utilizados: 100 mL de amostra de vinagre, 200 mL de acetato de etilo e realizadas 8 extrações.
- Caso ao fim de todas as extrações, o frasco de Fase Orgânica, contenha mais de uma fase, utilizar a centrifuga para a separação das fases e ficar apenas com a fase incolor que contém o solvente.
- Lembrar de fechar a torneira da ampola de extração antes de iniciar a transferência
- Verificar se a ampola não tem fugas
- Trabalhar em hotte com a exaustão ligada
- **Acetato de etilo:** conferir a identificação de perigos



## ANEXO II.

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem

Álcool residual (LBPV)	% v/v
Vinagre de outra origem	0,30
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,30
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	7,10
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,50
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,30
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,30
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,30
Vinagre de outra origem	0,50
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,30
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,10



Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

Álcool residual (LBPV)	% v/v
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,40
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,20
Vinagre de outra origem	0,30
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,15
Vinagre de outra origem	0,15
Vinagre de outra origem	0,21
Vinagre de outra origem	1,20
Vinagre de outra origem	0,10
Vinagre de outra origem	0,26
Vinagre de outra origem	0,24
Vinagre de outra origem	0,10

Álcool residual (LBPV)	% v/v
Vinagre de vinho	5,80
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,30
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,30
Vinagre de vinho	0,90
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,40
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,30
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,30
Vinagre de vinho	0,20

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,80
<b>Álcool residual (LBPV)</b>	<b>% v/v</b>
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,30
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,30
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	2,70
Vinagre de vinho	0,30
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,30
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	1,10
Vinagre de vinho	1,30
Vinagre de vinho	2,10
Vinagre de vinho	2,40
<b>Álcool residual (LBPV)</b>	<b>% v/v</b>
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	2,70
Vinagre de vinho	1,60
Vinagre de vinho	1,70
Vinagre de vinho	1,50
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,30
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,20
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	0,15
Vinagre de vinho	0,10
Vinagre de vinho	1,00
Vinagre de vinho	0,13
Vinagre de vinho	0,10

<b>Acidez total</b>	<b>g/l (ácido acético)</b>
Vinagre de outra origem	50,9
Vinagre de outra origem	51,0
Vinagre de outra origem	25,5
Vinagre de outra origem	49,5
Vinagre de outra origem	51,9
Vinagre de outra origem	10,5
Vinagre de outra origem	18,6
Vinagre de outra origem	41,4
Vinagre de outra origem	40,3
Vinagre de outra origem	51,4
Vinagre de outra origem	48,1
Vinagre de outra origem	50,3
Vinagre de outra origem	62,1

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

Vinagre de outra origem	53,5
Vinagre de outra origem	53,4
Vinagre de outra origem	41,7
Vinagre de outra origem	55,5
Vinagre de outra origem	81,9
Vinagre de outra origem	54,4
Vinagre de outra origem	57,6
Vinagre de outra origem	55,5
<b>Acidez total</b>	<b>g/l (ácido acético)</b>
Vinagre de outra origem	52,4
Vinagre de outra origem	72,3
Vinagre de outra origem	51,3
Vinagre de outra origem	52,4
Vinagre de outra origem	50,8
Vinagre de outra origem	41,0
Vinagre de outra origem	40,6
Vinagre de outra origem	55,1
Vinagre de outra origem	89,4
Vinagre de outra origem	50,1
Vinagre de outra origem	52,7
Vinagre de outra origem	51,6
Vinagre de outra origem	60,9
Vinagre de outra origem	50,8
Vinagre de outra origem	50,7
Vinagre de outra origem	52,5
Vinagre de outra origem	51,2
Vinagre de outra origem	50,5
Vinagre de outra origem	48,9
Vinagre de outra origem	50,9
Vinagre de outra origem	41,4
Vinagre de outra origem	42,0
Vinagre de outra origem	51,2
Vinagre de outra origem	51,2
Vinagre de outra origem	51,0
Vinagre de outra origem	51,2
Vinagre de outra origem	52,4
Vinagre de outra origem	119,4
Vinagre de outra origem	51,3
Vinagre de outra origem	87,4
Vinagre de outra origem	52,7
Vinagre de outra origem	87,6
Vinagre de outra origem	88,6

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

Vinagre de outra origem	94,7
Vinagre de outra origem	65,3
Vinagre de outra origem	51,7
Vinagre de outra origem	42,6
Vinagre de outra origem	50,0
Vinagre de outra origem	52,0
Vinagre de outra origem	43,6
Vinagre de outra origem	50,3
Vinagre de outra origem	49,6
Vinagre de outra origem	53,1
Vinagre de outra origem	52,5

<b>Acidez total</b>	<b>g/l (ácido acético)</b>
vinagre de vinho	64,0
Vinagre de vinho	41,2
Vinagre de vinho	64,8
Vinagre de vinho	61,8
Vinagre de vinho	60,1
Vinagre de vinho	59,2
Vinagre de vinho	69,8
Vinagre de vinho	63,5
Vinagre de vinho	62,2
Vinagre de vinho	72,2
Vinagre de vinho	61,5
Vinagre de vinho	61,5
Vinagre de vinho	60,4
Vinagre de vinho	62,8
Vinagre de vinho	61,6
Vinagre de vinho	61,2
Vinagre de vinho	61,5
Vinagre de vinho	60,6
Vinagre de vinho	111,4
Vinagre de vinho	111,6
Vinagre de vinho	60,9
Vinagre de vinho	101,4
Vinagre de vinho	61,2
Vinagre de vinho	59,6
Vinagre de vinho	57,4
Vinagre de vinho	71,3
Vinagre de vinho	71,4
Vinagre de vinho	50,8
Vinagre de vinho	61,4

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

Vinagre de vinho	71,4
Vinagre de vinho	61,0
Vinagre de vinho	61,0
Vinagre de vinho	60,1
Vinagre de vinho	70,0
Vinagre de vinho	61,2
Vinagre de vinho	60,3
Vinagre de vinho	71,8
Vinagre de vinho	71,7
Vinagre de vinho	42,0
Vinagre de vinho	72,5
Vinagre de vinho	70,4
Vinagre de vinho	42,0
Vinagre de vinho	60,3
<b>Acidez total</b>	<b>g/l (ácido acético)</b>
Vinagre de vinho	60,3
Vinagre de vinho	72,1
Vinagre de vinho	61,2
Vinagre de vinho	70,6
Vinagre de vinho	70,7
Vinagre de vinho	60,6
Vinagre de vinho	60,3
Vinagre de vinho	60,9
Vinagre de vinho	60,3
Vinagre de vinho	70,3
Vinagre de vinho	61,3
Vinagre de vinho	69,5
Vinagre de vinho	66,9
Vinagre de vinho	61,4
Vinagre de vinho	57,3
Vinagre de vinho	100,7
Vinagre de vinho	60,2
Vinagre de vinho	59,4
Vinagre de vinho	59,4
Vinagre de vinho	63,1
Vinagre de vinho	61,4
Vinagre de vinho	70,3
Vinagre de vinho	70,8
Vinagre de vinho	71,1
Vinagre de vinho	71,2
Vinagre de vinho	70,5
Vinagre de vinho	60,9

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

Vinagre de vinho	69,9
Vinagre de vinho	73,3
Vinagre de vinho	61,1
Vinagre de vinho	64,4
Vinagre de vinho	71,1
Vinagre de vinho	64,6
Vinagre de vinho	63,0
Vinagre de vinho	72,9
Vinagre de vinho	73,2
Vinagre de vinho	72,3
Vinagre de vinho	66,1
Vinagre de vinho	63,1
Vinagre de vinho	69,4
Vinagre de vinho	61,6
Vinagre de vinho	62,4
Vinagre de vinho	60,7
Vinagre de vinho	61,0
<b>Acidez total</b>	<b>g/l (ácido acético)</b>
Vinagre de vinho	71,6
Vinagre de vinho	59,7
Vinagre de vinho	59,7
Vinagre de vinho	58,9
Vinagre de vinho	60,1
Vinagre de vinho	59,7
Vinagre de vinho	61,3
Vinagre de vinho	59,7
Vinagre de vinho	61,9
Vinagre de vinho	63,4
Vinagre de vinho	60,4

<b>Dióxido de enxofre Total</b>	<b>mg/L</b>
Vinagre de outra origem	70
Vinagre de outra origem	76
Vinagre de outra origem	32
Vinagre de outra origem	83
Vinagre de outra origem	79
Vinagre de outra origem	99
Vinagre de outra origem	61
Vinagre de outra origem	112
Vinagre de outra origem	71
Vinagre de outra origem	106
Vinagre de outra origem	92

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

Vinagre de outra origem	169
Vinagre de outra origem	249
Vinagre de outra origem	160
Vinagre de outra origem	117
Vinagre de outra origem	74
Vinagre de outra origem	97
Vinagre de outra origem	78
Vinagre de outra origem	66
Vinagre de outra origem	110
Vinagre de outra origem	70
Vinagre de outra origem	3
Vinagre de outra origem	45
Vinagre de outra origem	142
Vinagre de outra origem	110
Vinagre de outra origem	70
Vinagre de outra origem	234
Vinagre de outra origem	119
Vinagre de outra origem	124
Vinagre de outra origem	168
<b>Dióxido de enxofre Total</b>	<b>mg/L</b>
Vinagre de outra origem	94
Vinagre de outra origem	75
Vinagre de outra origem	150
Vinagre de outra origem	118
Vinagre de outra origem	155
Vinagre de outra origem	96
Vinagre de outra origem	104
Vinagre de outra origem	62
Vinagre de outra origem	311
Vinagre de outra origem	194
Vinagre de outra origem	34
Vinagre de outra origem	71
Vinagre de outra origem	13
Vinagre de outra origem	42
Vinagre de outra origem	33
Vinagre de outra origem	100
Vinagre de outra origem	51
Vinagre de outra origem	58



Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

<b>Dióxido de enxofre Total</b>	<b>mg/L</b>
Vinagre de vinho	27
Vinagre de vinho	80
Vinagre de vinho	39
Vinagre de vinho	83
Vinagre de vinho	67
Vinagre de vinho	32
Vinagre de vinho	12
Vinagre de vinho	125
Vinagre de vinho	10
Vinagre de vinho	107
Vinagre de vinho	182
Vinagre de vinho	161
Vinagre de vinho	177
Vinagre de vinho	145
Vinagre de vinho	161
Vinagre de vinho	145
Vinagre de vinho	207
Vinagre de vinho	185
Vinagre de vinho	185
Vinagre de vinho	201
Vinagre de vinho	557
Vinagre de vinho	70
Vinagre de vinho	113
<b>Dióxido de enxofre Total</b>	<b>mg/L</b>
Vinagre de vinho	112
Vinagre de vinho	105
Vinagre de vinho	94
Vinagre de vinho	80
Vinagre de vinho	153
Vinagre de vinho	147
Vinagre de vinho	94
Vinagre de vinho	82
Vinagre de vinho	63
Vinagre de vinho	111
Vinagre de vinho	84
Vinagre de vinho	77
Vinagre de vinho	103
Vinagre de vinho	77
Vinagre de vinho	37
Vinagre de vinho	217
Vinagre de vinho	105
Vinagre de vinho	105

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

Vinagre de vinho	81
Vinagre de vinho	139
Vinagre de vinho	60
Vinagre de vinho	58
Vinagre de vinho	74
Vinagre de vinho	105
Vinagre de vinho	118
Vinagre de vinho	105
Vinagre de vinho	95
Vinagre de vinho	69
Vinagre de vinho	63
Vinagre de vinho	43
Vinagre de vinho	174
Vinagre de vinho	22
Vinagre de vinho	44
Vinagre de vinho	83
Vinagre de vinho	136
Vinagre de vinho	95
Vinagre de vinho	75
Vinagre de vinho	115
Vinagre de vinho	32
Vinagre de vinho	29
Vinagre de vinho	34
Vinagre de vinho	92
Vinagre de vinho	104
Vinagre de vinho	141

Tabelas com os dados das análises de álcool residual, acidez total e dióxido de enxofre total para os vinagres de vinho e outra origem (continuação)

<b>Dióxido de enxofre Total</b>	<b>mg/L</b>
Vinagre de vinho	81
Vinagre de vinho	248
Vinagre de vinho	56
Vinagre de vinho	33
Vinagre de vinho	26
Vinagre de vinho	79
Vinagre de vinho	68
Vinagre de vinho	82
Vinagre de vinho	44
Vinagre de vinho	101
Vinagre de vinho	60
Vinagre de vinho	338
Vinagre de vinho	81
Vinagre de vinho	112
Vinagre de vinho	45
Vinagre de vinho	96
Vinagre de vinho	54
Vinagre de vinho	114
Vinagre de vinho	110

### ANEXO III.

Resultados das amostras de vinagres na cromatografia em mg/L

Tipo	Metanol	Acetato de etilo	Álcoois superiores	Etanal	2-Butanol	n-Propanol	Isobutanol	n-Butanol	A. amílicos	Acetoína
Arroz	< LD	111,89	29,50	8,51	< LD	< LD	7,03	< LD	22,47	906,24
Arroz	< LD	231,54	26,40	21,82	< LD	< LD	4,27	< LD	22,13	1528,63
Arroz	4,47	143,39	17,62	12,95	< LD	< LD	2,83	< LD	14,79	1294,33
Arroz	3,52	206,13	16,91	8,72	< LD	< LD	3,99	< LD	12,92	1033,74
Figo	102,06	31,46	< LD	5,70	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	2144,75
Figo	62,77	27,93	15,71	3,55	< LD	< LD	3,80	< LD	11,91	838,09
Limpeza	< LD	3,97	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	6,37
Sidra	77,99	112,78	78,97	11,51	8,67	10,04	11,86	3,23	45,17	335,93
Sidra	275,98	49,32	73,95	8,62	< LD	2,38	16,96	13,93	40,68	1349,96
Sidra	265,71	51,21	75,30	9,35	< LD	2,11	17,14	14,43	41,62	1315,41
Sidra	25,83	58,49	55,37	44,16	< LD	< LD	10,62	5,08	39,67	388,66
Sidra	77,05	143,34	60,92	60,45	3,19	3,85	11,39	3,58	38,91	717,96
Sidra	38,98	84,53	9,40	21,18	< LD	< LD	3,16	< LD	6,24	451,65
Sidra	251,94	64,36	73,04	8,21	< LD	2,35	17,40	13,68	39,61	1290,54
Sidra	17,06	139,59	17,75	6,25	< LD	< LD	5,31	< LD	12,44	529,26
Sidra	41,15	98,47	15,81	11,70	< LD	< LD	3,85	2,57	9,39	817,52
Sidra	285,66	92,06	80,39	6,45	< LD	1,43	18,90	15,65	44,41	1450,25
Sidra	37,05	8,36	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	406,36
Sidra	29,16	96,17	10,93	18,21	< LD	< LD	3,70	< LD	7,23	711,80
Sidra	47,51	134,56	42,01	3,19	< LD	< LD	20,94	< LD	21,07	550,87
Uvas	59,16	127,17	23,92	18,48	< LD	< LD	7,06	2,19	14,67	685,60
Vinho	73,91	208,79	63,35	43,63	< LD	6,75	16,17	2,48	37,95	402,26

LD: limite detecção

Resultados das amostras de vinagres na cromatografia em mg/L (continuação)

<b>Tipo</b>	<b>Metanol</b>	<b>Acetato de etilo</b>	<b>Álcoois superiores</b>	<b>Etanal</b>	<b>2-Butanol</b>	<b>n-Propanol</b>	<b>Isobutanol</b>	<b>n-Butanol</b>	<b>A. amílicos</b>	<b>Acetoína</b>
Vinho	54,67	846,48	54,14	24,49	< LD	3,29	12,13	< LD	38,72	103,97
Vinho	53,67	567,23	48,75	23,04	< LD	2,06	11,37	< LD	35,32	106,94
Vinho	63,56	124,84	46,93	13,28	< LD	4,13	13,19	< LD	29,61	382,38
Vinho Branco	50,66	26,78	31,12	< LD	< LD	2,03	9,76	< LD	19,33	760,41
Vinho Branco	39,84	< LD	13,96	4,40	< LD	< LD	3,99	< LD	9,97	954,64
Vinho Branco	38,88	4,11	14,38	11,18	< LD	< LD	4,41	< LD	9,97	892,54
Vinho Branco	24,98	89,08	26,26	6,69	< LD	< LD	7,97	< LD	18,29	102,16
Vinho Branco	32,53	114,03	29,64	5,15	< LD	< LD	9,19	< LD	20,45	546,14
Vinho Branco	36,54	289,31	36,64	41,52	< LD	< LD	10,34	< LD	26,30	504,52
Vinho Branco	34,95	112,54	27,13	8,15	< LD	< LD	8,03	< LD	19,10	103,41
Vinho Tinto	54,07	106,32	38,42	9,15	13,83	< LD	6,91	< LD	17,68	564,22
Vinho Tinto	55,10	112,27	39,75	6,12	13,60	< LD	7,89	< LD	18,26	554,38
Vinho Tinto	66,31	6,94	28,16	11,33	< LD	< LD	8,88	< LD	19,28	513,50
Vinho Tinto	63,97	21,40	20,62	< LD	< LD	< LD	6,83	< LD	13,79	498,04
Vinho Tinto	51,13	75,73	33,96	10,49	14,01	< LD	6,22	< LD	13,73	529,37

LD: limite detecção